

Etude de trois ferments visqueux

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le Juin 1932

PAR

H. COTTIN

PROFESSEUR SUPPLÉANT

A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ANGERS

JURY

MM. LUTZ, *Président.*

BACH, *Chargé de Cours.*

MASCRÉ, *Agrégé.*

ANGERS

IMPRIMERIE SIRAUDEAU

6, place de la Visitation, 6

1932

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Etude de trois ferments visqueux

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le Juin 1932

PAR

H. COTTIN

PROFESSEUR SUPPLÉANT

A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ANGERS

JURY

MM. LUTZ, *Président.*
BACH, *Chargé de Cours.*
MASCRÉ, *Agrégé.*

ANGERS
IMPRIMERIE SIRAUDEAU
6, place de la Visitation, 6

1932

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. P. GUÉRIN, *Doyen*, *, ☉ I.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. *, ☉ I.
G. DURSENT, *Secrétaire*, *, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, *, ☉ I.	Botanique générale.
BÉHAL, Membre de l'Institut, G. O. *, ☉ I.	Chimie organique.
PERROT, O. *, ☉ I.	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIERE, O. *, ☉ I.	Zoologie.
LEBEAU, O. *, ☉ I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, *, ☉ I.	Chimie analytique.
GORIS, *, ☉ I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, *, ☉ I.	Physique.
DAMIENS, *, ☉ I.	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. *, ☉ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, *, ☉ I.	Hydrologie et Hygiène.
LUTZ, *, ☉ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ☉ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. *, ☉ I.	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, ☉ I.

Professeurs honoraires : MM. A. VILLIERS, *, ☉ I.
DELEPINE, O. *, ☉ I.
GUERBET, O. *, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, *, ☉ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. *, ☉ I.	Pharmacodynamie.
DELABY, *, ☉ I.	Minéralogie.
BACH, ☉ I.	Microbiologie.

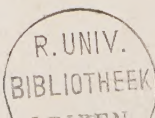
AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, ☉ A.	MM. BACH, ☉ I.
PICON, ☉ I.	BEDEL, ☉ I.
MASCRÉ, ☉ I.	RÉGNIER, ☉ I.
FLEURY, ☉ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☉ I., <i>agrége</i> , chargé des T. P. de 1 ^{re} année.	Chimie générale.
FLEURY, ☉ I., et RÉGNIER, ☉ I., <i>agregés</i> , chargés des travaux de	Chimie analytique.
SOUÈGES, ☉ I.	Micrographie.
LEROUX, ☉ I.	Physique.
DEVAL, ☉ I.	Microbiologie.
DELABY, *, ☉ I., PICON, ☉ I., et MASCRÉ, ☉ I., <i>agregés</i> , chargés des	Travaux généraux de 4 ^e année

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ☉ I.



A MONSIEUR LE PROFESSEUR LUTZ

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ BACH

Chargé de Cours de Microbiologie

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ MASCRÉ

A MONSIEUR LE DOCTEUR PAPIN

Chef du Laboratoire de Bactériologie d'Angers

A MON PREMIER MAITRE

MONSIEUR TIXIER

INTRODUCTION

La fermentation visqueuse est, depuis longtemps, observée dans les différents milieux alimentaires : vin, bière, lait. Le pain même n'en est pas exempt.

Ces altérations causent de réels préjudices aux fabricants ; c'est ainsi que nous avons été amené à examiner un certain nombre de limonades commerciales, visqueuses au point d'être invendables.

Vers la même époque il a été remis au Laboratoire de Bactériologie de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie d'Angers, une bière filante.

Enfin une eau de puits, examinée, s'est révélée gluante, bien qu'évidemment la viscosité fut beaucoup moins grande que dans les deux cas précédents.

L'eau souillée était riche en nitrates, ammoniacque et matières protéiques diverses ; cette fermentation ne pouvait être due qu'à une contamination occasionnelle.

Notre étude a porté sur ces trois ferments.

Depuis, l'occasion nous a été donnée d'observer d'autres microbes visqueux.

Ce sont d'abord, deux germes différents isolés d'urines purulentes et visqueuses.

Puis un autre ferment a été retiré d'un sirop de Tolu devenu filant.

Ces microorganismes feront l'objet d'un mémoire ultérieur.

Avant d'entreprendre notre étude, il nous faut remercier :

Messieurs les Professeurs Lutz et Bach qui ont bien voulu nous diriger dans cette entreprise.

Monsieur le Docteur Papin, qui non seulement, nous a pourvu de matériel et de livres techniques, mais qui encore nous a donné d'utiles conseils.

Monsieur le Professeur Gaudin qui, lui aussi, nous a encouragé et nous a fait profiter des bactéries visqueuses de sa collection.

HISTORIQUE ET BIBLIOGRAPHIE

Présentées dans l'ordre historique, les premières notions écrites qu'on ait des fermentations visqueuses remontent au xvi^e siècle, où *Jean Estienne* et *Jean Liébail* donnent dans « *la Maison rustique* » quelques recettes bizarres pour empêcher le vin de graisser dans les tonneaux.

Le début du xix^e siècle nous apporte des connaissances plus précises : c'est toujours le vin qui fournit le sujet du travail. *Chaptal* et *l'abbé Rozier* attribuent la fermentation visqueuse « à un principe extractif non élaboré et insuffisamment décomposé » (1).

En 1811, *Mandel*, doyen du Collège de Pharmacie de Nancy, publie un mémoire classé premier à un concours ouvert par la Société d'Agriculture, Sciences et Arts de la Marne ; le sujet était d'empêcher les fermentations visqueuses des vins. Mandel préconisait d'ajouter du tartrate acide de potasse pour empêcher cette fermentation.

En 1818, le Mémoire d'*Herpin* n'ajoute aucun fait nouveau à ce sujet (2).

(1) CHAPTAL, 1804 : Art de faire le vin, *Manuel*, 1813 (*C. R. Ann. trav. Soc. Agric. départ Marne*), cité par Kaiser et Manceau, *loc. cit.*, p. 6.

(2) HERPIN, 1819 : *De la graisse des vins* (1 br., Châlons), cité par Kayser et Manceau, *loc. cit.*, p. 6.

François (1), pharmacien à Epernay, publie de 1829 à 1831, une série d'articles sur la graisse des vins. La cause serait une substance azotée (la gliadine) que Taddée avait extraite du froment; le remède d'après lui serait d'ajouter du tannin, car le tanin précipiterait cette substance. Il constate que cette fermentation se produit dans les vins peu riches en alcool. Mais il faut attendre la révolution pastorianne pour connaître la cause de cette fermentation.

En 1861, *Pasteur* (2), étudiant les maladies des vins, examine les vins malades de « la graisse », pour lui, la cause de l'altération est un « chapelet de globules sphériques variant suivant les espèces de vin malade ». Il constate que le germe se trouve au fond de la bouteille, aggloméré en une masse mucilagineuse, analogue à la mère du vinaigre.

Après les travaux de Pasteur, il faut signaler ceux de *Börsch* (3), qui trouve la cause des vins malades en de petites chaînettes rondes.

Nessler (4), 1884, confirme cette observation.

En 1889, *Kramer* (5) décrit d'autres microbes visqueux: un « *Bacillus viscosus saccharii* », agissant sur des solutions neutres ou légèrement alcalines de saccharose, qui, en quelques jours, peuvent se prendre en masse.

Le bacille est un bâtonnet de 2 à 4 μ sur 1 μ de large.

(1) FRANÇOIS : *Mémoire sur la cause de la graisse des vins*, 1 br., Châlons-sur-Marne, 1829; Id., *Ann. Chimie*, 2^e sér., XLIV, p. 242, 1829; Id., *Traité d'application du tanin pour prévenir la graisse des vins*, 1 br., Châlons-sur-Marne, 1835.

(2) PASTEUR : *Études sur le vin*, p. 60, 1 vol., Masson, édit., Paris, 1866.

(3) BÖRSCH : *Beitrag zur Kenntniss der Bact. des Weines*, Diss., Erlangen, 1883.

(4) NESSLER : *Die Bereitung und Behandlung des Weines*, 1884, p. 225, Stuttgart.

(5) KRAMER, 1892 : *Studien über die schleimige gährung* (*Sitzungsber., der K. Akad. Wissensch. in Wien*, X, 1889, p. 467).

La masse est constituée par un ensemble de chaînettes formées par ces microorganismes. L'auteur n'a pas observé de sporulation ni de mobilité chez ces bacilles.

La gélatine est liquéfiée. Sur gélose, la culture est blanche. Les milieux acides ne conviennent pas à ces germes.

Outre ce bacille, Kramer isole un « *Bacillus viscosus vini* », bactérie acidophile qui rend le vin filant; son milieu préféré est un milieu glucosé. Il constitue de longues chaînettes, est immobile; sa taille est de 2 à 6 μ . de long, sur 0,6 à 0,8 de large, il cultive en anaérobiose.

Enfin une troisième espèce étudiée et trouvée dans un lait visqueux, est un microcoque dont les conditions de vie sont assez larges, puisqu'il se développe aussi bien dans les milieux faiblement acides que faiblement alcalins. La matière visqueuse formée serait pour lui voisine de la cellulose.

Déjà sur le lait, *Lœffler* (1) avait décrit sous le nom de « *Bacillus lactis pituosi* », une espèce qui rendait le lait filant. Ces bacilles se présentent en chaînettes, ils donnent des colonies blanc sale sur gélose et ne liquéfient pas la gélatine.

En 1889, *Adametz* (2) isole d'un lait un autre « *Bacillus lactis viscosus* », bactérie encapsulée de 1 μ . 5 de longueur sur 1 μ . de large. Ce microbe cultive bien sur tous les milieux usuels. Il paraît avoir assez d'analogie avec le bacille de *Lœffler* et le microcoque de *Kramer*.

Ces bactéries diffèrent les unes des autres par les caractères de culture. Leur forme est plus ou moins arrondie. La capsule leur est commune.

(1) LÖEFLER : Ueber Bakterien in der Milch (*Berl. klin. Wochenschrift*, 1887).

(2) ADAMETZ : Ueber einen Erreger der schleimigen Milch (*Milch Zeitung.*, 1889, p. 941).

D'ailleurs Ward (1) isole une espèce identique à celle d'Adametz dans du lait et de la crème.

C'est dans une eau souillée que G. et P. Frankland (2) décrivent un autre « *Bacillus viscosus* ». La viscosité de ce bacille est bien moindre que celle des précédents puisqu'elle ne se communique pas aux milieux de culture.

En 1892, Van Laër (3) étudie la fermentation visqueuse de la bière. Il note que le sucre joue seulement un faible rôle.

Il expose successivement l'origine et les caractères microscopiques de ses ferments: ce sont des bacilles grêles de 1 μ 6 à 2 μ 4 de long sur 0 μ 8 de large. Leurs caractères physiologiques sont établis dans un certain nombre de milieux :

1° L'infusé de viande de Lœffler gélatinisé, dans lequel les cultures sont blanches « d'un aspect rappelant la moëlle épinière mise à nu après l'enlèvement des méninges »:

2° L'infusé de viande de Lœffler gélosé: les cultures sur ce milieu se font à la fois en surface et en profondeur, elle ne sont pas aussi caractéristiques que les précédentes;

3° Le moût de bière liquide:

4° Le moût de bière gélatinisé: il n'y a pas de développement en surface sur ce milieu:

5° Le saccharose peptonisé: Van Laër nomme ainsi des solutions de saccharose et de peptone, les unes

1) WARD: Ropiness in milk and cream (*Bull. of the Cornell University Agricultural experiment. station*, Ithaca N. Y., 1889).

(2) Grâce et Percy FRANKLAND: Über einige typische Microorganismen in Wasser und in Boden (*Zeischr. für Hygiene*, IV, 1889, p. 373).

(3) VAN LAËR: Note sur les fermentations visqueuses (*Mémoires couronnés de l'Acad. Royale de Belgique*, t. LIII, 1889).

acides, les autres neutres. L'acidité croît en fonction des matières azotées.

Les différences de caractères de culture permettent à Van Laër de distinguer deux espèces: « *Bacillus viscosus* » 1 et 2.

Ces deux bacilles communiquent au moût de bière liquide et au saccharose peptonisé des degrés viscosimétriques différents. Les milieux neutres sont plus favorables à la viscosité.

Van Laër emploie encore comme autres milieux de culture, le lait, la pomme de terre, la mie de pain neutralisée, le liquide de Pasteur, une liqueur uro-asparaginée, un liquide de Pasteur glyciné, le liquide de Mayer et enfin une autre solution avec ou sans sucre qui convient très bien aux cultures des ferments visqueux. Cette solution contient:

Peptone	1
Sucre candi	3
Sulfate de magnésie.....	0,05
Chlorure de calcium.....	0,01
Phosphate bipotassique ...	0,50
Eau	100

Van Laër compare ses bacilles:

Au « *Bacillus mesentericus vulgatus* » de Flügge, qui ne liquéfie pas la gélatine;

A l'« *Actinobacter polymorphus* » de Duclaux (1) qui ne végète ni sur l'amidon, ni dans les milieux glycinés;

Au « *Bacillus panificans* » de Laurent (2);

Malgré bien des analogies de culture, « jamais la

(1) DUCLAUX : *Traité de chimie biologique*, p. 562, t. IX, 4^{re} section, de l'Encyclopédie chimique de Frémy.

(2) LAURENT : La bactérie de la fermentation panaire (*Bull. de l'Acad. Royale de Belgique*, 3^e sér., t. X, n° 12, 1885).

mie de pain, introduite dans du moût de bière, n'en a provoqué le filage ».

Enfin au « *micrococcus ureæ* » de Pasteur.

Il n'y a pas identité entre aucun de ces microorganismes et les bacilles de Van Laër.

Les circonstances favorisant la viscosité des cultures sont :

La température; optimum vers 33°.

La quantité croissante de matières azotées, « la maladie est d'autant plus grave que la proportion de substances azotées est plus grande ». Pour démontrer ce fait, Van Laër publie des échelles viscosimétriques qui croissent proportionnellement aux quantités de peptone.

La présence de sulfate de chaux, « loin d'agir comme antiseptique, favorise singulièrement la fermentation visqueuse ».

L'air enfin favorise la croissance des germes visqueux.

Quant aux circonstances qui entravent la fermentation, ce sont les présences : d'acidité, d'alcool, d'antiseptiques tels que l'acide salicylique et l'acide sulfureux.

Van Laër conclut que le filage des bières est dû, non seulement à une modification de leurs substances hydrocarbonées, mais aussi à une altération de leurs substances azotées. Les filages produits par ses bacilles « donnent naissance à deux matières glaireuses, l'une de nature azotée, l'autre soluble dans l'eau, de nature inconnue ».

Lindner (1) examinant une fermentation visqueuse produite dans du vin du Rhin, l'attribue au « *Dema-tium pullulans* ».

(1) LINDNER : *Wochenschrift für Brauerei*, 1888, p. 290.

Hansen (2) publie, en 1895, un mémoire sur le mode d'étude des levures et la formation de la matière visqueuse.

Happ (3) en 1893 décrit un « *Bacillus gummosus* », isolé d'une infusion végétale devenue filante.

Ce sont des bâtonnets de $5\ \mu$ à $7\ \mu$ de long sur $0\ \mu$ 6 de large, ils sporulent et sont mobiles.

La matière gommeuse produite au dépens du sucre est soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool et l'éther.

Les sous-produits de la fermentation sont : de la mannite et des acides gras (acides lactique, acétique).

Meissner (4) donne une étude détaillée de *Torules* produisant la fermentation visqueuse.

Ces *Torules* sont désignées du nom des vins d'où elles ont été isolées :

1) Markgrafer Edelwein; 2) Unsberger A; 3) Eitelsbacher; 4) Wiesbadener Schleimfe I; 5) Nahewein; 6) Stuttgarterwein; 7 et 8) Udenheim I et II; Wiesbadner Schleimhefe II; 10 et 11) Arenga I et II.

L'isolement de ces germes a été fait sur gélatine au moût de bière.

Les milieux de culture employés sont : du moût de vin sucré à 10 et 15 %, contenant jusqu'à 10 gr. d'acide tartrique par litre.

Les moûts de vin étudiés sont des moûts de vin du Rhin et des moûts de Sicile, ces milieux peuvent être rendus solides par de la gélatine.

1) Un bouillon à base d'extrait Liebig, de moût de vin et de peptone.

(2) HANSEN : *Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie* (München et Leipzig, Oldenbourg, 1890-1892, Heft 2, p. 43).

(3) HAPPE : Bacteriologische und chemische Untersuchungen über die schleimige Gährung (*Centralblatt für Bakt.*, XIV, 1893, p. 175).

(4) MEISSNER : Studien über das Zähwerden von Most und Wein (*Landwirtschaftliche Jahrbücher*, XXVII Band., 1898, Heft 5).

2) Les liquides de Raulin et de Laurent.

La morphologie de ces espèces ne varie guère de 3 à 8 μ de long, de 2 à 5 μ de large. La forme est ronde ou ovoïde selon les espèces. Certaines Torules contiennent des vacuoles, d'autres pas. Le glycogène présent chez les uns manque chez les autres. Meissner observe pour quelques espèces des formations mycéliennes.

Cet auteur, ignorant les travaux de Guilliermond, note parfois l'absence de noyau.

Toutes ces Torules ne sporulent pas, elles donnent des voiles et des anneaux de façon irrégulière.

Les colonies géantes des espèces sont différentes les unes des autres.

Dans la physiologie des germes visqueux, Meissner note que la fermentation est en rapport avec la composition du milieu, les sucres étant les aliments de choix.

L'oxygène est indispensable, le gaz carbonique ne paraît pas gêner les Torules.

L'alcool atteignant 9 % empêche les germes de se développer. La fermentation visqueuse est contrariée par la fermentation vinique. Les sels ammoniacaux la favorisent au contraire.

Les antiseptiques étudiés sont : 1°) l'acide sulfureux, à la dose de 2 gr. de bisulfite de soude par litre.

2°) Le tanin, Meissner croit peu à l'efficacité de ce corps.

Les Torules sont acidophiles, Meissner leur fait supporter jusqu'à 2 % d'acide acétique. La lumière joue un rôle retardateur, la demi-obscurité est préférable.

La limite de température maxima est comprise entre 50 et 60° suivant les espèces.

La résistance à la sécheresse est d'une dizaine de jours.

Avec ses Torules, l'auteur a réussi à rendre filantes d'autres boissons fermentées, par exemple le cidre et la bière.

Pour éviter tous les mécomptes de la fermentation visqueuse, les germes se trouvant dans le moût, Meissner conseille la vinification dans des caves fraîches avec un moût stérile.

Comme le vin, le cidre, la bière, le pain est également en proie aux ferments visqueux.

Uffelmann (1) signale une altération du pain due au « *Bacillus mésentéricus vulgatus* » et déjà notée par Van Laër.

Furhmann (2) décrit une bactérie du même genre « *Bacterium panis* » qui rend filante la mie de pain et dégage une odeur agréable.

Pour terminer avec le pain signalons l'étude de *Kaiser* et *Delaval* (3) qui ont isolé d'une mie de pain visqueuse un bacille légèrement courbe de 3 μ 6 sur 0, μ 4 à 0, μ 6, très mobile et donnant des spores ovoïdes. Il trouble le bouillon sur lequel il produit un léger voile.

Il coagule le lait et le peptonise légèrement. Sur le pain il donne une coloration jaune et une odeur désagréable due à des composés valérianiques.

Nicolas (3) a rencontré un bacille visqueux dans les fausses membranes d'une angine; ce bacille rend le bouillon gélatineux.

Pane (4) a isolé du sang d'un âne malade, un bacille

(1) UFFELMANN : Verbotenes Brot (*Centralblatt für Bakt.* VIII, 1890, p. 481).

(2) FURHMANN : Über die Erreger des Fadenziehens beim Brot, 1905 (*Centralblatt für Bakt.* 2^e Abth., XIV, 1905, p. 385).

(3) KAISER et DELAVAL : Etude du pain visqueux (*C. R. Acad. Sc.*, CLIII, 1911, p. 576).

(3) NICOLAS : Sur la consistance d'une angine pseudo-membraneuse atypique et d'un microbe nouveau (*Arch. de méd. expér.*, X, p. 573, 1898).

(4) PANE : Zur Biologie eines pathogenen *Bacterium viscosum* (*Centralblatt für Bakt.* 4^{te} Abth., Orig., XL, 1906, p. 279).

qui rend le bouillon très visqueux, il l'a nommé : « *Bacillus viscosus pathogènes* ».

Mazé et Pacottet (1) ont étudié en 1904, un bacille en longues chaînes, différent du ferment mannitique et vivant en anaérobiose. Ce ferment produirait de l'alcool.

La même année, *Laborde* (2) isole deux microbes (l'un pouvant supporter 5 à 6 gr. d'acide sulfurique par litre), il leur attribue la propriété de rendre un liquide visqueux par formation d'une gaine qui semble se dissoudre dans le liquide.

« On peut constater sa présence en la précipitant par l'alcool fort : c'est une matière cellulosique analogue au dextrane de Scheibler. Elle ne réduit pas la liqueur de Fehling, mais chauffée avec, se précipite sous forme de grumeaux gélatineux. A l'autoclave à 110° avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique elle s'hydrolyse et donne du glucose. »

En 1908, *Kayser* (3), professeur à l'Institut Agronomique, fit paraître en collaboration avec *Manceau*, chimiste aux établissements Moët et Chandon, un travail remarquable : « Des ferments de la graisse des vins ».

Ces deux auteurs ont passé plusieurs années à étudier les ferments, ils signalent d'abord la difficulté qu'il y a à rompre les symbioses des microorganismes qui produisent la graisse. (Symbioses existant entre des bacilles ou levures aérobies et d'autres germes spécifiques de la graisse vivant en anaérobiose.) Grâce aux voiles secrétés par les premiers, les seconds peuvent vivre à l'abri de l'air.

(1) MAZÉ et PACOTTET : Recherches sur la maladie des vins (*Ann. de l'I. P.*, t. XVIII, 1904, p. 245).

(2) LABORDE : Sur les ferments des vins gras ou filants (*Procès-verbaux des séances de la Société Sc. phys. et nat.*, Bordeaux, 1904).

(3) KAYSER et MANCEAU : *Ferments de la graisse des vins* (1 vol., Epernay, H. Villiers, 1909).

Les ferments de la graisse ne sporulent pas et vivent en anaérobiose.

La température agit sur la culture suivant son âge et suivant le milieu. La limite maximum varie entre 50° et 60°, l'optimum entre 30 et 40°. Sur milieux solides les colonies se forment en profondeur et en brèches. Sur milieux liquides il y a dégagement de gaz carbonique. Aucune odeur ne se produit.

Certains hydrates de carbone ne sont pas attaqués. Ce sont : la mannite, la dulcité, la dextrine et l'alcool. D'autres hydrates de carbone le sont plus ou moins, suivant le ferment employé.

L'acidité supportée varie suivant la composition du milieu, elle ne dépasse pas 10 % d'acide, exprimé en acide lactique.

L'azote est nécessaire aux ferments, la peptone est pour eux un élément favorable, par contre d'autres matières azotées ne leur conviennent pas : le phosphate d'ammoniaque, le tartrate, le nitrate de potasse, l'acétamide, l'urée, le glyocolle, l'asparagine, l'alanine, la leucine, la gélatine et l'albumine de l'œuf.

Les exigences minérales sont restreintes.

Des acides : acétique, lactique, carbonique, de la mannite et de l'alcool sont formés par fermentation. Mais pour un même ferment « Les rapports entre les produits sont variables et dépendent des conditions de l'expérience et de la combinaison du milieu ».

Ces sous-produits de la fermentation limitent la réaction.

La proportion du sucre exerce une influence sur la formation de l'alcool.

L'acidité qui convient le mieux est d'environ 1 gr. par litre en acide sulfurique. Au-dessus de cette dose l'action devient défavorable, mais ce n'est encore là qu'une moyenne.

Le tanin n'a pas une grande influence, les ferments résistent à 0,2, 0,5, 1 et 2 gr. de tanin par litre.

Le gaz sulfureux doit être ajouté à dose de 0 gr. 20 pour dose préventive, mais il faut au moins 0 gr. 50 pour arrêter une fermentation bien établie.

Une dose d'alcool, supérieure à 10 % retarde la fermentation, l'enraye au-dessus de 14 %, quoique les vins ne graissent guère au-dessus de 12 %.

Les phosphates et les sels de potasse favorisent la viscosité.

Les auteurs indiquent que les levures peuvent occasionner dans les vins des fermentations visqueuses.

Ils concluent :

« La graisse est une maladie microbienne dont l'évolution dépend de la composition générale du vin et des conditions dans lesquelles il est placé. L'insuffisance du tanin n'est pas, en général, la cause principale de l'altération. Les variations de l'alcool et de l'acidité jouent un rôle bien plus important que la variation du tanin. »

Thöni et *Thayssen* (1) en 1912, traitent d'un « *Micrococcus mucifaciens* » rendant le lait visqueux.

Fernbach et *Schœn* (2) ont observé une bactérie qui produit une fermentation visqueuse, la glaire formée est constitué par un lévulosane.

Récemment, étudiant le « *Leuconostoc mésentéroïdes* », ils ont noté que la glaire formée donne du glucose par hydrolyse.

Guyot (3) en 1927 mentionne la fermentation visqueuse des potions, de l'eau de fleur d'oranger même, choses observées fréquemment en pharmacie, puis il

(1) THÖNI ET THAYSEN : Mittheil.a.d. geb. d. Lebensmittelsuntersuchung (*Hyg. Berne*, Bd 3, 1912, H. 335) et (*Centralblatt für Bakt.* 1, 56, p. 592, Referata).

(2) FERNBACH ET SCHOEN (*C. R. Soc. Biologie*, t. CLV, p. 84, 1912); Id. (*C. R. Soc. Biologie*, t. XCII, p. 141, 1925).

(3) GUYOT : Fermentations visqueuses des limonades commerciales (*Bull. Soc. de Pharmacie de Bordeaux*, 1927, p. 138).

décrit ensuite la fermentation visqueuse d'une limonade.

Une Torule a été isolée de cette limonade. Cette Torule vit soit en aérobiose, soit en anaérobiose, elle attaque bien les sucres et montre une préférence marquée pour le saccharose, le glucose et le lévulose.

Cet organisme supporte bien l'acidité qui cependant limite son développement.

La substance formée est un dextrane qui peut régénérer le glucose par hydrolyse.

La Torule transportée dans un milieu naturel : vin, bière, lait ou dans différents types de potions, communique une certaine viscosité à tous ces milieux.

La fermentation visqueuse est pour Guyot une fermentation synthétique pouvant se produire dans tous les milieux.

Le sucre est l'aliment de choix de la Torule, l'acidité joue un grand rôle dans son développement.

Enfin, *Bordet et Renaux* (1) étudiant l'influence du calcium sur les cultures du charbon ont signalé une modification visqueuse de la bactériodie, dont l'aspect des colonies peut devenir même huileux.

« La substance constitutive de la gaine prend une nuance rougeâtre par le bleu de toluidine, de sorte que traités par ce colorant, les articles engainés apparaissent au microscope comme de gros tronçons rouges dans l'axe desquels on distingue parfois assez malaisément le bâtonnet lui-même, qui se teint en bleu. »

Le Charbon sur gélose oxalatée, c'est-à-dire sur gélose débarrassée de calcium, fournit par repiquages successifs, des cultures de plus en plus visqueuses. Par contre sur gélose calcifiée la viscosité disparaît et la bactériodie reprend son aspect normal.

(1) BORDET et RENAUX : L'influence du calcium sur les cultures de charbon (*Ann. de l'I. P.*, t. XLV, 1930, p. 23).

« L'influence très favorisante que l'oxalate exerce sur la production de la matière glaireuse est utile à connaître pour les auteurs qui se proposent de poursuivre l'étude de la nature chimique de la substance. »

En résumé, tous ces travaux font ressortir l'extrême variété de germes susceptibles de produire la fermentation visqueuse.

PREMIÈRE PARTIE

Étude du ferment de la limonade

CHAPITRE PREMIER

Étude morphologique

A) ISOLEMENT

La limonade visqueuse a été diluée dans un bouillon glucosé à 10 % etensemencée sur gélose. Des colonies blanches ne tardèrent pas à se montrer.

Ces colonies examinées au microscope étaient constituées par des bacilles courts et des levures rondes.

La séparation des deux organismes présente une certaine difficulté sur laquelle ont déjà insisté, Kayser et Manceau et qui tient à ce que la glaire agglomère le tout.

On arrive cependant à la séparation par repiquages répétés, un des éléments finissant par prendre le dessus sur l'autre.

On étale une goutte de liquide sur gélose inclinée, puis on prélève une légère partie de cette glaire étalée que l'on reporte dès le début du développement des

colonies sur une autre gélose et ainsi de suite, jusqu'à obtention de colonies pures, homogènes et séparées.

Ce procédé général a été utilisé au début; plus tard connaissant les affinités électives des germes, leur séparation devint plus facile. On ensemence par exemple, la limonade sur carotte. Seule la levure pousse, on reporte ensuite un peu de la culture sur gélose inclinée et on obtient ainsi très rapidement une culture pure.

Pour déterminer le rôle respectif des deux organismes dans la production de la matière visqueuse, on a ensemencé, puis maintenu à 25° trois tubes de bouillon préparés de la façon suivante :

1^{er} TUBE: le bacille à l'état de culture pure : aucune fermentation visqueuse ne s'est produite.

2^e TUBE: la levure à l'état de culture pure : après quatre jours le bouillon est très visqueux.

3^e TUBE: l'association bacille et levure : la fermentation est analogue au 2^e tube, le bouillon possède le même degré de viscosité.

On peut donc conclure que l'agent spécifique de la viscosité est la levure.

B) MORPHOLOGIE

La levure se colore par les couleurs basiques de l'aniline et prend le Gram. C'est une grosse espèce, de dimensions variant avec le milieu et avec l'âge de la culture.

Dans une culture florissante, sur carotte par exemple, sa forme est nettement ovoïde. Ses dimensions maxima sont de 10 μ sur 4 μ (fig. 1).

Dans une culture sur Raulin ou sur divers autres milieux tel que le vin, la bière, la limonade ou une solution sucrée additionnée d'antiseptiques, les dimen-

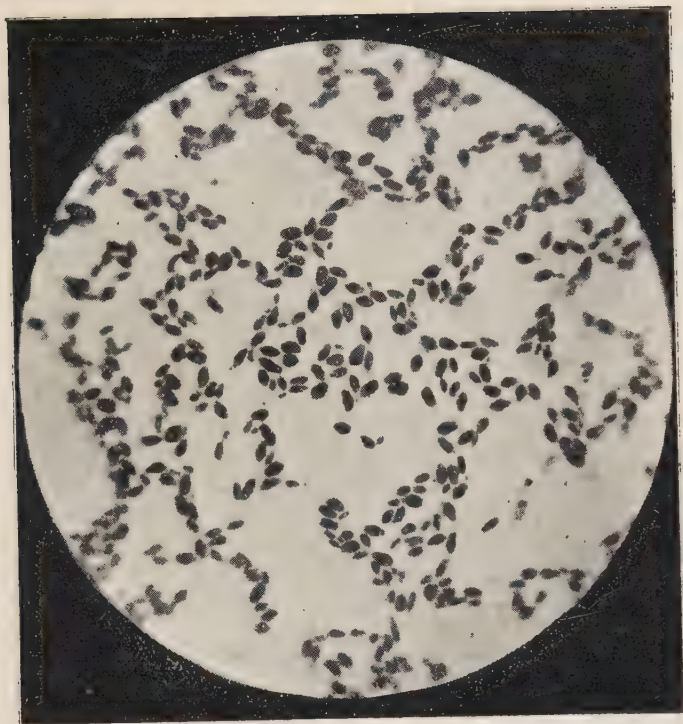


Fig. 1. — Levures sur carotte. — Grossissement : 600



Fig. 2. — Levures provenant d'un dépôt visqueux
mises en évidence par la méthode de Gins.

sions sont moindres : 4 à 5 μ de diamètre et la forme est beaucoup plus arrondie (fig. 1 et 2).

Les formes mycéliennes sont rares et ne comportent que quelques éléments. La levure n'est pas mobile. Elle présente :

- a) une membrane.
- b) un cytoplasme.
- c) un noyau.

a) *La membrane*

Comme on l'a déjà vu, la membrane joue un rôle important dans la fermentation visqueuse.

Cette partie de la cellule est difficile à mettre en évidence. Salkowski conseille le traitement à l'iode qui colorerait en brun la membrane; au contraire Will et Casagrandi affirment que celle-ci ne se colore, ni par l'iode, ni par les colorants usuels de la cellulose.

Hansen a observé des dépôts visqueux dans les fermentations de brasserie, ces dépôts sont constitués par des réseaux dont l'ensemble rappelle les zoogléas et qui sont formés de cellules englobées dans un réseau visqueux provenant de la coalescence des membranes glaireuses.

Kayser et Manceau n'ont pas cherché à colorer ces membranes. Pour mettre en évidence leur hypertrophie, ils injectent quelques bulles d'air dans une goutte de dépôt et observent le long de la bulle d'air (1).

On peut encore observer la gaine sans coloration. On prend une parcelle de culture visqueuse, on l'étale avec une lamelle, en faisant varier le point. La masse visqueuse s'étale sous la pression.

Mais ces procédés ne donnent pas des résultats très nets. Après coloration au bleu de méthylène on remar-

(1) KAYSER et MANCEAU : *Ferments de la graisse des Vins*, page 21, loc. cit.

que deux parties dans la membrane; l'une limitant le cytoplasme apparaît comme une ligne bleu foncé assez vague, l'autre forme une auréole autour de la cellule.

Cette dernière retient mal le bleu et seule, on le verra plus loin, la méthode de Gins, à l'encre de Burri, permet de la mettre en évidence.



Fig. 3. — *Formation des réseaux de Hansen*

Cellules foncées colorées en bleu par le violet de gentiane, les autres et le fond en rose par la fuchsine.

b) *Le cytoplasme*

Il subit de grandes variations dans la vie de la levure. Au début, dense et homogène, se colorant bien par le bleu, il se creuse de vacuoles en vieillissant.

1) *Recherche du glycogène*

On traite un frottis glaireux, par la solution de Lugol, après l'avoir fixé par l'alcool ou la chaleur. Une première fois la coloration fut effectuée sans succès sur une culture âgée de plusieurs jours.

Mais en traitant après fixation par l'alcool à froid au moyen de la liqueur iodo-iodurée, pendant un quart d'heure, un frottis de culture âgée seulement de 24 heures, on a pu mettre en évidence les grains de glycogène colorés en brun. Avec d'autres cultures vieilles de 48 heures rien de semblable : le glycogène a disparu. Cette disparition rapide n'est pas pour nous

surprendre; le glycogène, substance de métabolisme, est essentiellement transitoire.

2) Recherche des grains métachromatiques

a) *Méthode au bleu de méthylène.* — On fixe la préparation au moyen d'une solution saturée de sublimé, puis on colore au bleu de méthylène, la métachromatine prend une teinte rouge violacée.

b) *Méthode à l'hématoxyline.* — La méthode à l'hématoxyline nous a permis de mettre en évidence les grains métachromatiques colorés en rouge vineux.

Ils existent dans la cellule au voisinage des vacuoles et plus ou moins disséminés, ils disparaissent au fur et à mesure que la cellule se vide.

3) Recherche des grains basophiles

Les grains basophiles apparaissent en partie décolorés par la méthode à l'hématoxyline.

La levure contient peu de grains basophiles dans ses formes jeunes, mais ceux-ci sont plus nombreux au fur et à mesure que la cellule vieillit.

4) Recherche des globules de graisse

Par action de la teinture d'Orcanette. — On n'observe aucune coloration à ce réactif.

Le résultat négatif de ces essais fait conclure à l'absence de globules de graisse.

c) Le Noyau

Meissner signale l'absence de noyau dans certaines formes de Torules. Il se sert de ce caractère pour distinguer certaines espèces. La question a bien changé depuis 1898.

Si le noyau existe, il est fort difficile de le distinguer des grains métachromatiques.

C) DÉVELOPPEMENT

Pour étudier le développement de la levure on part de quelques cellules, qui sont placées sur gélose, dans une chambre de Van Tieghem.

Deux modes de vie ont été observés :

1° Des cellules isolées, formes trouvées dans l'eau de la chambre de Van Tieghem.

2° Des formes, groupées en paquets agglomérés par la glaire, comme il est représenté dans les réseaux de Hansen, ces réseaux se constituent deux jours après ensemencement, à une température de 35°. On rencontre ces formes sur les milieux solides ou dans les dépôts visqueux.

Sur les milieux solides les réseaux finissent par couvrir la totalité de la surface libre.

Dans les milieux liquides, les réseaux de Hansen se constituent par floculation de la glaire ainsi que nous le verrons plus loin.

Enfin, on a observé de rares formations mycéliennes sur les bords de la goutte de gélose de la chambre de Van Tieghem; ces formations ne sont que de quelques articles; les cellules alors sont de forme allongée.

D) SPORULATION

La levure ne sporulant pas spontanément, nous avons essayé plusieurs méthodes, que nous avons fait suivre d'une coloration à l'hématoxyline.

1) Méthode des blocs de plâtre. — Cette méthode n'a donné aucun résultat.

2) Partant d'une culture jeune, on décante le liquide surnageant qu'on remplace par un liquide isoto-

nique non nutritif, le tout est porté au voisinage de l'optimum (32°-35°). Le résultat est également négatif.

3) Par addition d'un antiseptique léger à du bouillon sucré (acide sulfureux à faible dose, vingt milligr. par litre). Nous avons observé à 40°, un voile et un anneau gluants, mais jamais de spores.

Cette absence de sporulation nous oblige à conclure que la levure est une Torule.

CHAPITRE II

Milieux de culture

Pour l'étude des différents milieux le guide suivi a été le travail de *Grimbert* (1).

1° MILIEUX USUELS

A) *Bouillon peptoné*. — Bouillon ordinaire salé et peptoné (peptone de la marque Chapoteaut). La *Torule* pousse bien sur ce milieu, on observe au bout de quelques jours une culture visqueuse.

Il se forme au fond du tube un léger dépôt blanc, granuleux, floconneux, filant. Examiné au microscope, il montre de rares formations mycéliennes (surtout dans un bouillon alcalin) et des réseaux.

A la surface du milieu il se forme parfois un anneau hyalin. Les éléments qui le constituent sont analogue à ceux du dépôt.

L'odeur de la culture est nulle.

B) *Gélose inclinée*. — Les colonies sont blanc sale, visqueuses, en taches de bougies, puis les colonies se joignent en une masse hyaline qui couvre entièrement la gélose.

(1) GRIMBERT : *De l'unification des cultures en bacteriologie*, Paris, 1898 (et *Extrait des Archives de Parasitologie*, t. I, 1898).

C) *Gélose à la bière. Colonies géantes.* — Meissner emploie pour l'obtention de colonies géantes, un milieu de formule suivante :

Gélatine	10 gr.
Bièrè	12 gr..
Gélose nutritive.....	78 gr.

On coule une hauteur de 2 cm. de ce milieu sur boîte de Pétri; on ensemence au centre de la gélose. On peut employer la boîte de Roux de contamination moins facile, mais dans laquelle il est impossible de photographier la culture.

Les colonies sont d'un blanc crèmeux, elles envahissent peu à peu la surface de la gélose.

Un mois après ensemencement environ, à la température de 25°, la culture est uniformément glaireuse et les détails deviennent indistincts.

Deux mois après, la masse hyaline est en partie résorbée, la culture est moins visqueuse, elle est veinée au centre.

D) *Gélatine.* — Les colonies sont blanc-crème. En piqûre elles s'étendent assez profondément le long de la piqûre, il n'y a pas de liquéfaction.

E) *Carotte.* — Les colonies sont blanches, quelquefois roses et se rejoignent rapidement pour donner une masse hyaline et glaireuse sur toute l'étendue de la carotte.

Le liquide sous-jacent devient rapidement visqueux et trouble.

La carotte est un milieu de choix pour la *Torule*.

F) *Betterave.* — La betterave constitue un bon milieu, la levure pousse cependant mieux sur la carotte, bien que le liquide sous-jacent soit plus visqueux.

G) *Pomme de terre*. — Ce milieu est moins favorable que les précédents.

La masse visqueuse obtenue est peu importante et centrale à la base ; elle est plus étendue et ramifiée au sommet. Le liquide sous-jacent est peu visqueux.

H) *Liquide de Raulin*. — La stérilisation a été réalisée à froid au filtre Chamberland.

La viscosité de ce liquide ensemencé par la Torule n'est jamais très considérable.

I) *Liquide de Hansen n° 1*. — La composition de ce liquide est la suivante :

Peptone	1 gr.
Dextrose	5 gr.
Phosphate	0 gr. 3
Sulfate de magnésie....	0 gr. 2
Eau distillée.....	100 gr.

Ce milieu a été essayé, on le verra plus loin, pour l'étude des sucres il convient assez bien. Le phosphate bipotassique a l'avantage de stabiliser le milieu dans la zone pH 5,5 — pH 7.

K) *Liquide de Pasteur*. — La solution employée contenait :

Tartrate d'ammoniaque..	1 gr.
Sucre candi.....	10 gr.
Cendres de levure.....	1 gr.
Eau	100 gr.

Le liquide de Hansen donne de meilleurs résultats, c'est pourquoi nous l'avons préféré.

2) ETUDE DES SUCRES, ALCOOLS POLYATOMIQUES
ET HYDRATES DE CARBONE

Les cultures ont été faites :

1) Dans du bouillon peptoné sucré dans lequel le saccharose peut être remplacé par un autre hydrate de carbone. Pour ces essais il est préférable d'utiliser le bouillon Martin privé de sucre.

2) Dans du liquide de Hansen n° 1 dans lequel le dextrose est remplacé par un autre hydrate de carbone.

3) Dans des solutions contenant seulement le produit à étudier en dissolution dans l'eau.

Les produits employés sont de la marque R. A. L..

Le glucose a été recristallisé dans l'alcool et porté à l'étuve afin d'éliminer les dernières traces d'alcool.

Les proportions des produits employés ont été 1, 5, 10, 20 %. La stérilisation a été réalisée par trois chauffages à 100° afin d'éviter l'altération des produits.

Ces essais ont été effectués à la température de 25°.

1) *Milieux au bouillon peptoné avec :*

A) *Saccharose.* — On s'assure au moyen d'un témoin que la solution ne réduit pas la liqueur de Fehling.

La Torule a produit, une huitaine de jours après ensemencement une viscosité très appréciable, cette viscosité croît d'abord en fonction du temps, passe par un maximum, décroît ensuite lentement puis sensiblement reste constante.

Le sucre est partiellement interverti, on peut le constater au polarimètre et à la liqueur de Fehling.

La déviation était avant ensemencement de $+9^{\circ}50'$.

Une huitaine de jours après, déviation de $+ 6^{\circ} 24'$; quinze jours après, déviation de $+ 3^{\circ} 2'$. Environ un mois après la déviation devient négative.

La liqueur de Fehling est réduite après quelques jours de culture.

Toute une partie de cette étude sera consacrée aux transformations que le ferment fait subir au milieu.

Notons que la solution de neutre devient acide.

B) *Glucose*. — On obtient un résultat analogue au précédent, la viscosité est cependant moins marquée.

C) *Lévulose*. — La viscosité est moindre que dans les solutions précédentes, il faut compter 3 semaines pour obtenir une viscosité comparable à celle obtenue en une semaine sur le milieu au saccharose. La décroissance de la viscosité est aussi plus rapide.

D) *Mannose*. — Viscosité analogue à celle du milieu au lévulose.

E) *Maltose*. — Cultures peu visqueuses, il a été nécessaire d'ensemencer abondamment.

F) *Lactose et galactose*. — La viscosité du bouillon lactosé ou galactosé ne diffère pas de celle qu'on obtient dans un bouillon non sucré. Elle est insignifiante.

G) *Glycérine*. — On observe souvent dans ce milieu la formation d'un anneau visqueux.

Le bouillon est visqueux.

H) *Mannite*. — La viscosité obtenue est un peu inférieure à celle du milieu précédent, on n'observe pas d'anneaux.

I) *Dextrines*. — La viscosité s'y produit bien. La

Torule ne montre pas d'affinité spéciale vis-à-vis des dextrines d'origines différentes.

K) *Inuline*. — Le bouillon inuliné devient peu visqueux.

L) *Amidon*. — Cet hydrate de carbone a été utilisé à 2 %, en décocté dans du bouillon. Le décocté est filtré. Ce milieu est très peu visqueux. L'empois de l'amidon n'est pas liquéfié par la Torule.

On n'observe aucune culture sur ce milieu.

2) *Milieux au liquide de Hansen*

Les milieux à base de bouillon entretiennent fort bien la viscosité, mais le bouillon n'est pas un milieu chimiquement défini, sa composition est variable. C'est pourquoi, nous lui avons préféré le liquide de Hansen n° 1, pour une étude viscosimétrique plus complète.

Nous avons utilisé les différences de degrés viscosimétriques afin de nous rendre compte des progrès de la viscosité.

Le degré de viscosimétrique a été défini par Van Laër (1): « le nombre de secondes qu'il faut à 50 cc. de liquide pour s'écouler à travers une ouverture de 3 millimètres de diamètre ».

Pour une bonne compréhension des résultats, nous avons dressé le tableau ci-dessous :

(1) VAN LAER, *loc. cit.*

DEGRÉS VISCOSIMÉTRIQUES A 15°	Avant ensem- cement	4 jours après	8 jours	15 jours	1 mois	2 mois
Liquide de Hansen sans sucre.....	17	21	23	25	23	21
Liq. Hansen sans peptone + 10 gr. glucose 0/0..	18	38	48	60	62	54
Liq. Hansen + peptone + 2 gr. glucose 0/0...	17	27	35	38	36	33
Ib. + 5 gr. 0/0 glucose..	18	30	42	46	48	45
Ib. + 10 0/0 glucose....	18	40	50	63	65	57
Ib. + 20 0/0 glucose ...	19	45	56	75	80	72
Ib. + 10 0/0 saccharose	18	44	58	82	83	74
Ib. + 10 0/0 lévulose...	18	30	38	43	48	44
Ib. + 10 0/0 mannose..	18	32	37	46	46	42
Ib. + 10 0/0 maltose...	18	28	35	39	38	33
Ib. + 10 0/0 lactose....	18	22	24	26	25	22
Ib. + 10 0/0 galactose..	18	26	27	27	25	24
Ib. + 10 0/0 glycérine..	18	28	36	42	40	38
Ib. + 10 0/0 mannite...	18	27	33	40	41	36
Ib. + 10 0/0 dextrine...	21	29	34	39	42	39
Ib. + 2 0/0 d'amidon...	19	23	25	28	28	26
Ib. + 10 0/0 inuline....	18	22	26	30	31	29

3) *Sucres, alcools polyatomiques,
hydrates de carbone en solution dans l'eau*

Dans ces conditions, les solutions de saccharose, glucose, lévulose, mannose, glycérine deviennent seules nettement visqueuses.

La viscosité est proportionnelle à la quantité de produit en solution.

Un mois après ensemencement un sirop de saccharose, de densité $d = 1,32$, a perdu sa fluidité ; on peut retourner le tube qui le contient sans crainte d'accident.

Deux mois après, bien que très visqueux, le sirop a repris en partie sa fluidité initiale.

Résumé

Le sucre est nécessaire à la fermentation visqueuse produite par la Torule et la viscosité croît proportionnellement aux quantités de produit en solution.

Tous les sucres, hydrates de carbone, alcools polyatomiques ne conviennent pas également. Le saccharose et le glucose sont des éléments de choix, viennent ensuite le lévulose, le mannose, la glycérine, la dextrine, la mannite et le maltose. En présence d'amidon, d'inuline, de lactose, de galactose, la Torule ne communique pas une viscosité très appréciable aux milieux qui les contiennent.

Enfin l'intervention du saccharose, la consommation du sucre par la Torule, la réversibilité du phénomène feront l'objet d'un chapitre particulier.

3) ETUDE DES MILIEUX AZOTÉS

Les différentes substances étudiées sont : la peptone, l'albumine de l'œuf puis des milieux plus simples : les sels ammoniacaux et l'ammoniaque, les nitrates, les nitrites, l'urée, l'acide cyanhydrique, la monométhylamine.

Les peptones et l'albumine de l'œuf sont suffisantes pour entretenir à elles seules la vie de la levure. Quant aux autres dérivés azotés s'ils modifient la fermentation visqueuse dans un sens ou dans l'autre ils ne peuvent entretenir la vie de la Torule par leurs propres moyens aussi a-t-on dû les ajouter à un milieu nutritif par lui-même.

A) Etude de la peptone

On emploie la peptone Chapoteaut en solution à 1, 2, 5 et 10 % dans l'eau distillée.

A 1 % la Torule produit une opalescence légère la viscosité est peu accentuée. On observe quelques rares formes filamenteuses, les Torules sont petites et arrondies.

A 2 %, on ne peut guère noter de différences appréciables avec la solution à 1 %, la solution est à peine plus visqueuse.

A 5 %, la viscosité est un peu plus appréciable..

A 10 %, la viscosité est moindre et le dépôt filant moins abondant.

Les degrés viscosimétriques avant et après ensemencement sont peu différents; ainsi que l'indique le tableau ci-dessous :

DEGRÉS VISCOSIMÉTRIQUES	Avant ensemencement	4 jours après	8 jours	15 jours	1 mois	2 mois
Solutions de peptone :						
à 1 0/0.....	16 1/2	17	20	20	19	18
à 2 0/0.....	16 1/2	19	20	21	21	20
à 5 0/0.....	17	20	22	24	24	22
à 10 0/0.....	17 1/2	19	21	22	22	21

Recherche de l'indol. — L'indol est recherché sur culture en eau peptonée à 5 % avec 5 0/00 de chlorure de sodium.

Ces cultures ayant été portées au voisinage de l'optimum, on a essayé, huit jours après ensemencement, la réaction de Salkowsky et la réaction de Legal.

Réaction de Salkowsky. — (Formation de nitrosoindol). On ajoute à 15 cc. de liquide visqueux XXX gouttes de solution de nitrite de potasse à 1 %, on agite légèrement et on laisse couler le long du verre XX gouttes d'acide sulfurique pur.

Réaction de Legal. — On ajoute au liquide V gouttes de solution de nitroprussiate de soude à 5 %, on agite, puis on fait tomber quelques gouttes de lessive de soude à 40 %. Le liquide devient rougeâtre avec X gouttes d'acide acétique, il vire au bleu vert dans le cas d'indol.

Ces réactions ayant toutes été négatives nous concluons que la Torule ne produit pas d'indol.

B) *Etude de l'albumine cuite*

On coupe du blanc d'œuf coagulé, en cubes. On porte un cube dans un tube à pomme de terre de façon qu'il repose sur l'étranglement. Dans le fond du tube, on a mis un peu d'eau pour réaliser l'humidité favorable aux microorganismes. On stérilise à 105°.

On ensemence superficiellement par une goutte de bouillon sucré visqueux coulant sur l'albumine cuite.

On a pu observer, après huit jours, une réduction des angles et le trouble du liquide inférieur (ce liquide étant limpide avant ensemencement). La diminution du cube s'est accentuée avec le temps et l'albumine s'est recouverte d'un enduit rouille.

Deux mois après le début de cet essai il ne restait presque plus de blanc d'œuf, la Torule l'avait désagrégé. Le liquide sous-jacent était très visqueux et de réaction alcaline, aussi y a-t-on recherché l'ammoniaque. On a recherché en outre l'élément réducteur et les peptones.

a) *Recherche de l'ammoniaque.* — On prélève une petite quantité de liquide à laquelle on ajoute de la soude on chauffe et on porte dans l'axe du tube une goutte de réactif Nessler, on obtient une coloration rouge brun : donc présence d'ammoniaque ou de sels ammoniacaux.

b) *Recherche de l'élément réducteur.* — Cette recherche faite au moyen de la liqueur Fehling est positive.

c) *Recherche des peptones.* — On débarrasse d'abord le liquide des albumines par coagulation à chaud en présence d'acide trichloracétique, on filtre et sur le filtrat on fait réaction du biuret (1) :

(1) Les réactions xanthoprotéique, de Millon et glyoxylique réalisées ultérieurement ont été également positives. La désintégration de l'albumine n'a donc pas été poussée très loin.

A quelques centimètres cubes de solution protéique, on ajoute 1 centimètre cube de soude à 10 % pour alcaliniser fortement, puis une solution de sulfate de cuivre à 1 % qu'on fait tomber goutte à goutte avec une pipette. La première goutte donne une teinte rose violacée, qui vire au violet par l'addition ultérieure de réactif.

G) Etude des sels ammoniacaux

Nous avons établi deux types de sels ammoniacaux : sel dérivé d'acide fort : chlorhydrate d'ammoniaque ; sel dérivé d'acide faible : carbonate d'ammoniaque.

a) *Chlorhydrate d'ammoniaque*. — On prépare trois tubes contenant du bouillon sucré à 10 %. Un tube est gardé comme témoin. Dans un autre tube, on ajoute 0,5 % de chlorhydrate d'ammoniaque ; dans le dernier 1 % de ce sel. Le tout est tyndallisé à 60°, puis ensemencé et porté à l'étuve à 25°.

Après trois jours de culture : le tube témoin contenait un liquide bien visqueux.

Le tube contenant 0,5 % de chlorhydrate donnait le même résultat au bout de six jours.

« Dans le tube à 1 % on n'a jamais pu obtenir une viscosité analogue au liquide du tube témoin.

Degrés viscosimétriques à 30°	Avant ensemencement	3 jours après	6 jours après	45 jours après	4 mois après
—	—	—	—	—	—
Tube témoin	20	34	45	60	80
Tube à 0,5 0/0	20	27	35	52	48
Tube à 1 0/0	20	22	28	32	30

En remplaçant le bouillon peptoné sucré par du liquide de Hansen sans peptone, on obtient des résultats analogues.

b) *Carbonate d'ammoniaque*. — Van Laër (loc. cit.) note le fait que la bière fermentée n'est pas un milieu propice à ses bacilles mais que sous l'influence du carbonate d'ammoniaque, on obtenait une abondante fermentation visqueuse.

Nous avons comparé deux séries de milieux : Une série de milieux témoins et une autre série de milieux contenant 1 % de carbonate d'ammoniaque.

Nous avons constaté l'influence favorable de ce corps, les milieux au carbonate d'ammoniaque possèdent des degrés viscosimétriques plus élevés et l'action reversible qui se manifeste, après un certain temps de fermentation visqueuse, est retardée.

Nous reviendrons sur cette action favorable et nous étudierons l'action des tartrates et succinates d'ammoniaque, corps susceptibles d'influencer la réaction du milieu.

D) *Etudes des nitrates*

On emploie le nitrate de potassium en solution à 1 % dans du bouillon sucré. Le milieuensemencé comparé au témoin n'a pas montré de différence sensible.

E) *Etude des nitrites*

Le nitrite de soude en solution à 1 % dans du liquide de Hansen sucré, de réaction acide, retarde et diminue la fermentation visqueuse. La viscosité du bouillon reste faible. Le dépôt examiné au microscope est constitué par des *Torules* atteignant à peine 4 à 5 μ et se développant mal.

F) *Etude des amides*

Nous avons utilisé l'urée en solution à 1 % dans du liquide de Hansen sucré sans peptone. Cette solution a été tyndallisée pour éviter l'hydrolyse.

Cette amide ne semble pas modifier la fermentation visqueuse.

G) *Etude des nitriles*

Nous avons choisi l'acide cyanhydrique. Une dilution au 1/1000 empêche la *Torule* de donner sa viscosité habituelle, réensemencée ensuite sur milieu favorable elle ne donne qu'une maigre culture. La dose mortelle est 0,4 % environ.

H) *Etude de l'ammoniaque et des amides*

Nous avons comparé l'ammoniaque aux mono et triméthylamines. Ces corps, en solution à 0,5 % dans du bouillon sucré, possèdent une action retardatrice sur la fermentation visqueuse. Ils agissent par la réaction alcaline qu'ils communiquent aux milieux. Le chlorhydrate de ces amines exerce une action analogue au chlorhydrate d'ammoniaque.

I) *Etude des acides aminés*

L'asparagine aux doses de 0,5, 1, 2 % favorise la viscosité.

K) *Etude des amino-alcools*

D'une façon moins nette que le carbonate d'ammoniaque et l'asparagine, la choline en solution à l'état de chlorhydrate 0,5 % et 1 % favorise la viscosité.

Résumé

L'azote sous forme de carbonate, d'ammoniaque d'asparagine, de choline favorise la viscosité.

Les formes : acide cyanhydrique, nitrite, chlorure d'ammonium sont néfastes à la Torule.

Cette étude succincte sera complétée par des travaux postérieurs.

4) MILIEUX NATURELS

A) *Etude du lait*

Le lait stérilisé est un lait de commerce, très légèrement alcalinisé et dans lequel on élimine la lactalbumine par une première ébullition suivie de filtration. La stérilisation a été réalisée par trois chauffages à 100° à 24 heures d'intervalle. (Le chauffage à 115° altérerait le lactose et pourrait peptonifier la caséine).

Pour mesurer la viscosité du liquide nous avons dû abandonner le procédé indiqué par Van Laër.

Ce procédé exige une quantité de milieu trop considérable (50 cc.) pour chaque détermination.

Les indications données sont insuffisantes pour des liquides peu visqueux, le diamètre de l'ouverture (3 millimètres) étant trop élevé.

Nous avons pensé substituer au tube de Van Laër, soit le viscomètre dont on se sert pour déterminer la viscosité des huiles, soit un compte-gouttes officinal. Ce dernier moyen était le plus simple aussi, Monsieur le Professeur Lutz nous l'a-t-il conseillé. Le compte-gouttes capillaire dont on se sert est d'assez fort calibre et gradué en centimètres cubes. On prend soin de l'entourer d'un manchon contenant de l'eau à 15° (la température influant sur la vitesse d'écoulement du liquide, les essais doivent être effectués à la même température).

Un centimètre cube de lait stérilisé et filtré s'écoule en 19 secondes. Ce même laitensemencé après quinze jours met 28 secondes à s'écouler.

Après un mois la coagulation se produit.



Compte-gouttes officinal

Fig. 4

Le lait additionné de tournesol vire peu-à-peu au rose. Nous avons dosé l'acidité produite au moyen d'une solution de soude N/10, 10 cc. de masse visqueuse formée un mois après ensemencement exigent 0, cc. 7 de solution de soude ce qui correspond à 0 gr. 68 d'acide lactique.

Nous avons recherché la présence de présure, le lait étant neutralisé avec un peu de carbonate de chaux. Les quelques gouttes de liquide que nous avons pu obtenir, ajoutées au lait frais n'ont pas coagulé ce milieu.

Nous n'avons pas observé de sécrétion de caséase.

La culture dégage une odeur butyreuse laissant supposer une fermentation butyrique, mais étant don-

né la quantité réduite de liquide nous n'avons pu faire la détermination délicate de l'acide butyrique.

La coagulation du lait peut être expliquée par la seule augmentation d'acidité.

B) *Etude du vin*

Plusieurs types de vin ont été étudiés :

1) Un vin blanc titrant 10° alcooliques des côteaux de Saumur.

2) Un vin blanc de 13° alcooliques des côteaux du Layon.

3) Un vin rouge de 10°.

4) Un vin de muscat de 15°.

Deux séries d'essais ont été effectuées :

1) Avec des vins tyndallisés à 60° pendant 5 jours.

2) Avec des vins non tyndallisés.

Ces deux séries ont donné dans tous les cas des résultats identiques.

1) *Vin blanc (Côteaux de Saumur)*. — Reprenant le système de Van Laër, nous avons procédé à deux séries d'essais viscosimétriques avec :

a) Le vin titrant 10° alcooliques, dont l'acidité totale, exprimée en acide sulfurique, est de 3 gr. 60 par litre et la teneur en glucose 4 gr. 80 par litre.

b) Le même vin, dont le titre alcoolique a été abaissé à 8°, mais dont la composition est restée identique.

Le résultat est traduit par le tableau ci-dessous :

DEGRÉS VISCO- SIMÉTRIQUES	Avant ensemencement	1 jour après	2 jours	3 jours	4 jours	8 jours	10 jours	15 jours	20 jours	30 jours
Vin de 10°	46	19	24	28	32	38	40	42	39	34
Vin de 8°	46	22	28	33	37	43	46	39	52	45

Ces résultats peuvent être traduits en courbe, en portant les viscosités en ordonnées et les temps en abscisses ainsi que l'a fait Van Laër.

L'acidité croît d'abord avec le temps, puis reste constante, à partir du quinzième jour environ. Elle atteint alors :

Pour l'échantillon de 10° : 3 gr. 90 par litre.

Pour l'échantillon de 8° : 4 gr. 10 par litre.

Cette acidité étant exprimée en acide sulfurique.

La teneur du vin en glucose diminue par contre de façon continue. Après un mois : le vin de 10° ne contient plus que 4 gr. 10 et le vin de 8° 3 gr. 85.

Le titre alcoolique est resté constant.

2) *Vin blanc 13° (Côteaux du Layon)*. — Ce vin riche en glucose contient en outre de petites quantités de glycérine.

Pendant les trois premières semaines, nous n'avons observé aucune culture, le milieu n'était pas visqueux.

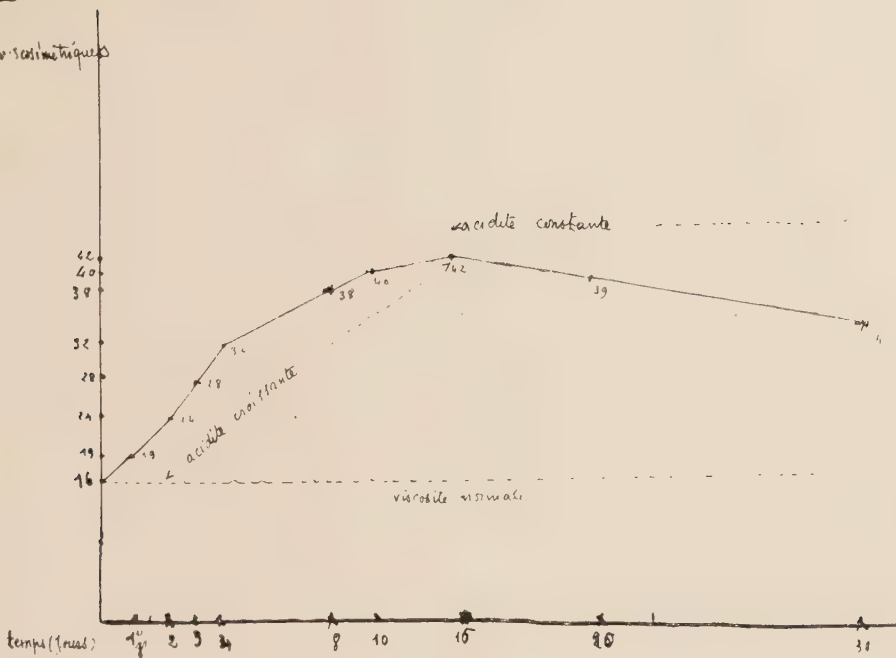
La quatrième semaine nous avons remarqué la formation d'un dépôt filant, au fond du tube.

Un mois après la viscosité du liquide était légère mais appréciable.

Nous avons noté alors une augmentation d'acidité

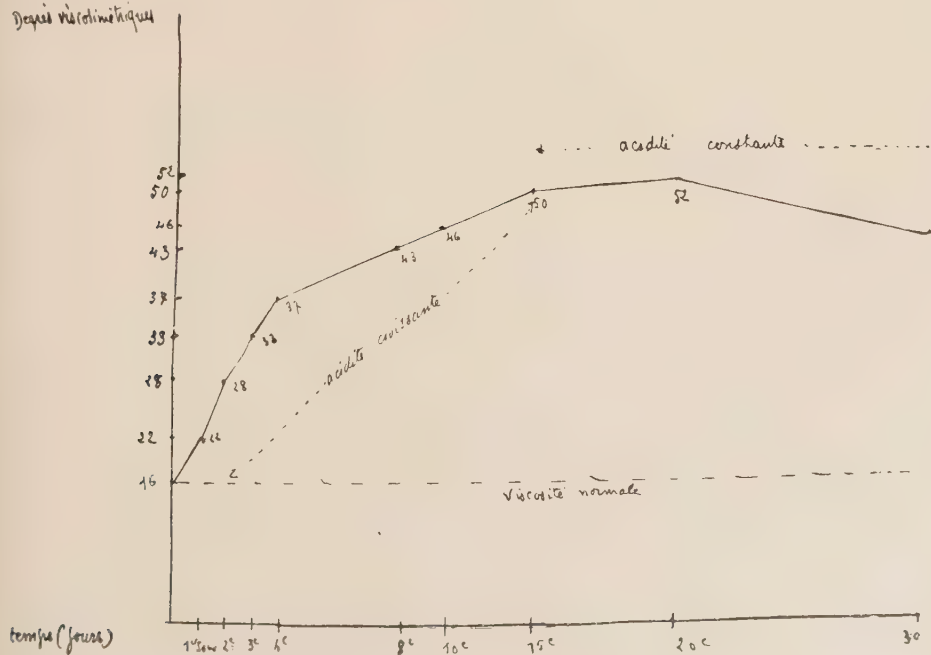
Vin de 10° →

Depuis viscosimétriques



Vin de 8° -

Depuis viscosimétriques



et une diminution du titre alcoolique, tombé de 13° à 11°.

Degré viscosimétrique du vin avant ensemencement
16°

un mois après :
18°.

deux mois après :
24°.

3) *Vin rouge 13° (Breton) (Côteaux de la Loire)*. — Nous avons obtenu rapidement un dépôt floconneux et filant. Ce dépôt serait dû à une réaction du tanin sur la glaire (fait observé par Meissner, Kayser et Manceau).

Le liquide est peu visqueux. Le degré alcoolique est tombé de 10° à 9°. Enfin l'acidité totale du vin, exprimée en acide sulfurique, est passée de 4 gr. 40 à 4 gr. 80 après un mois de culture.

4) *Vin de muscat (Société andalouse 15°)*. — La Torule n'a donné aucune culture sur ce milieu.

Résumé

La présence d'alcool contrarie la fermentation visqueuse qu'on n'observe jamais dans un vin titrant plus de 13°. Le degré alcoolique limite, varie d'ailleurs avec la composition du vin, plus particulièrement avec sa teneur en sucre et son acidité.

Le sucre est nécessaire dans la fermentation visqueuse, la Torule le consomme d'une façon continue.

L'acidité croît d'abord avec la viscosité, puis reste constante. Dès que l'acidité n'augmente plus la viscosité commence à décroître.

Enfin la fermentation produit souvent une diminution du titre alcoolique du vin.

C) *Etude du moût de vin*

Le moût de vin provenait des côteaux du Layon récolte 1929 ; ce moût est riche en sucre réducteur, aussi la Torule a-t-elle donné une culture visqueuse.

Nous avons essayé un jus de raisin spécialisé « le Quotidien » mais l'antiseptique qui assure la conservation de ce milieu a gêné le ferment et les cultures sont peu visqueuses.

D) *Etude du cidre*

C'est un cidre doux de 6° alcooliques, peu acide ; il provient des environs de Segré (M.-et-L.) récolte 1929. Le cidre a été tyndallisé par cinq chauffages à 60°.

La levure rend le cidre visqueux ; le cidre ne noircit pas. Il se forme un dépôt très filant après une dizaine de jours de culture.

L'acidité du liquide augmente, après un mois de culture le titre alcoolique du cidre n'est plus que de 5°.

La Torule agit sur le cidre de la même manière que sur le vin. On observe une diminution du sucre, une augmentation d'acidité et une légère consommation d'alcool.

E) *Etude de la bière*

Nous avons comparé deux échantillons de bière : l'un avec son gaz carbonique, l'autre privé de ce gaz.

Le titre alcoolique était de 5°. Les deux échantillons ont été tyndallisés.

La Torule dans les deux cas a donné des cultures également visqueuses, le gaz carbonique ne semble pas l'incommoder.

L'acidité de la bière augmente comme l'acidité du cidre et du vin.

F) *Etude de la limonade commerciale*

La Torule communique une grande viscosité à ce milieu.

Le sucre y est interverti puis consommé, l'étude de cette altération sera reprise plus loin.

L'acidité de la limonade déjà notable est restée constante.

G) *Etude du pain*

Le pain sous l'influence de certains germes peut devenir filant. Nous avons, en conséquence, préparé des tranches de pain, qui ont été introduites dans des tubes à pommes de terre, stérilisées puisensemencées avec la Torule.

Après une quinzaine de jours le pain est couvert d'un enduit blanc sous lequel il apparaît mou et gonflé ; le liquide sous-jacent est légèrement visqueux et de réaction acide, il réduit la liqueur de Fehling.

CHAPITRE III

Influence des agents extérieurs

1° ACTION DE L'OXYGÈNE

Les ferments visqueux peuvent se diviser en deux catégories au point de vue de l'action exercée sur eux par l'oxygène.

Pour les uns, ce gaz est indispensable : les ferments de Van Laër et de Meissner, par exemple.

D'autres, au contraire, ceux de Mazé, Pacottet, Kayser et Manceau sont des anaérobies stricts.

La Torule de Guyot peut vivre dans les deux cas.

Nous avons suivi le développement de notre germe dans du bouillon peptoné à 5 %, salé à 7 0/00 et sucré à 10 %.

D'autre part nous avons vu précédemment que sur gélatine en piqûre, les cultures se produisent surtout en surface.

Sur tous les milieux usuels la levure se comporte comme un germe aérobie mais à la rigueur, elle peut se développer en anaérobiose.

1) Dans les tubes contenant le bouillon sucré nous avons ajouté une légère couche d'huile de paraffine environ 2 cc ; le tout a été stérilisé, puisensemencé.

Au bout de quelques jours, les milieux étaient troubles mais la viscosité était moindre que celle des témoins cultivés en aérobie.

Cette méthode n'étant pas très rigoureuse nous avons eu recours à la technique de Pasteur.

2) L'appareil employé comporte un tube à deux branches munies chacune d'une effilure latérale. Le tube est stérilisé au four à flamber.

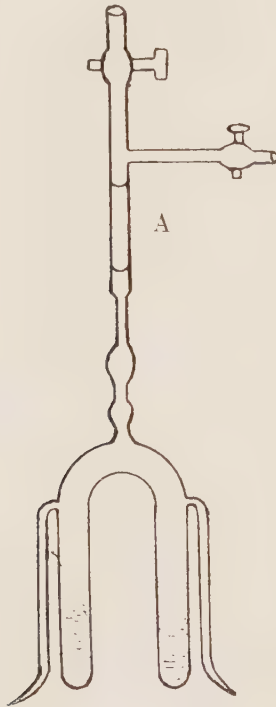


Fig. 5

A l'aide des effluves latérales que l'on ferme ensuite à la flamme, on introduit dans une branche, du liquide nutritifensemencé et dans l'autre du liquide pur.

On fait le vide en reliant la partie supérieure A, à une trompe vide.

Si on désire examiner le liquide on relie l'extrémité du tube A à l'appareil à vide et l'on casse la pointe

dans le caoutchouc intermédiaire. En brisant l'extrémité de l'effilure latérale on fait couler la quantité de liquide voulue.

3) Le vide n'est pas absolu, aussi avons nous adopté le dispositif suivant :

Deux tubes à essais sont réunis l'un à l'autre, chacun d'eux possède une extrémité effilée à la partie supérieure.

Les pointes du double tube étant ouvertes, on introduit dans l'un par aspiration le bouillon sucré stérilisé.

Après avoir obstrué avec du coton stérile les deux extrémités, on stérilise à nouveau, puis on ensemence. La culture étant bien partie (deux à trois jours), on introduit dans l'autre branche un mélange de 2 gr. d'acide pyrogallique dissous dans 20 ou 30 cc. d'eau et 20 cc. de lessive de potasse à 36° B. au 1/10^e, on ferme immédiatement à la lampe les deux branches effilées.

La culture se produit dès lors en anaérobiose. Dans ces conditions, la viscosité du bouillon a notablement augmenté. Après deux mois nous avons examiné au microscope le dépôt visqueux.

Les Torules sont rondes et petites. Nous avons recherché en vain, les spores par la coloration à l'hématoxyline.

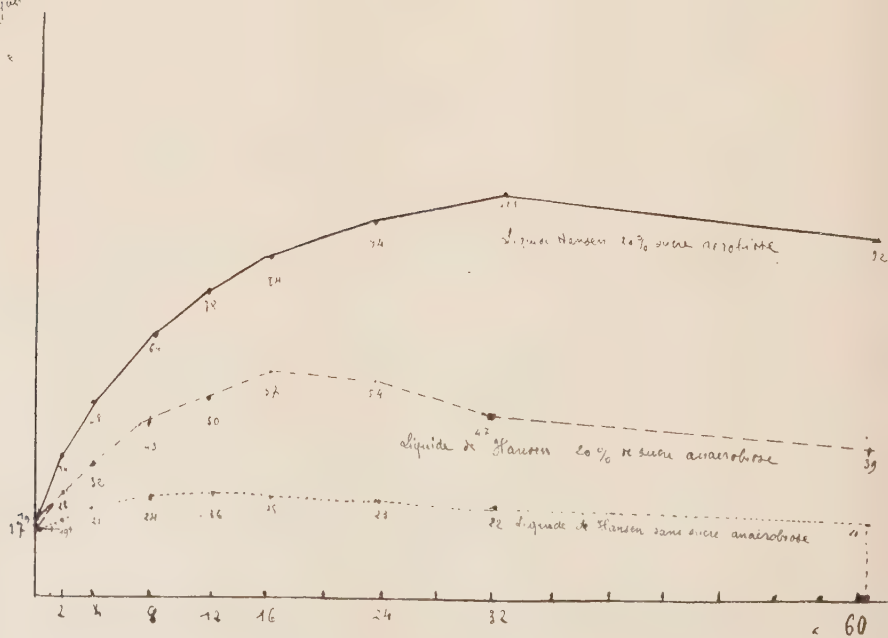
Le liquide s'est acidifié comme dans l'aérobiose, le sucre a été également interverti (réduction de la liqueur de Fehling).

Nous avons comparé les variations de viscosité des cultures aérobies et anaérobies, cultures faites dans du liquide de Hansen sucré avec 20 % de saccharose et du liquide de Hansen non sucré.

Les résultats sont exprimés par le tableau et le graphique ci-dessous :

DEGRÉS VISCOSIMÉTRIQUES	Avant ensemencement	2 jours après	4 jours	8 jours	12 jours	16 jours	24 jours	32 jours	60 jours
Liquide de Hansen sans sucre, anaérobiose..	17	19	21	24	26	25	23	22	20
Liq. de Hansen 10 0/0 sucre, anaérobiose..	19	26	32	43	50	57	54	47	39
Liq. de Hansen 20 0/0 sucre, aérobiose....	19	34	48	66	78	84	94	101	92

*Requis
la détermination
Vanier*



Recherche de l'alcool

1) *Méthode à l'iodoforme.* — On distille le liquide visqueux ; au premier quart distillé on ajoute 2 gouttes de lessive de soude ; on chauffe à 40-50° et on verse goutte à goutte une solution iodo-iodurée à 1 % jusqu'à coloration jaune brunâtre qu'on fait disparaître par une goutte de soude. On laisse refroidir et on porte au microscope un peu de dépôt formé. En présence d'alcool il doit se former des cristaux d'iodoforme de forme hexagonale.

Cette réaction a lieu également avec l'acétone et l'aldéhyde ordinaires. A cause de cette particularité on fait un autre essai mettant dans un autre tube, autant d'ammoniaque que de centimètres cubes de liquide distillé à examiner et en ajoutant quelques gouttes de solution iodée ; avec l'alcool il se produit un précipité gris noir et permanent d'iodure d'azote. Avec l'aldéhyde et l'acétone, ce précipité est remplacé par le trouble jaunâtre de l'iodoforme.

2) *Méthode au sulfate chromique.* — Au distillat on ajoute une solution de bichromate de potasse à 1 %, on acidule fortement avec de l'acide sulfurique ; on chauffe, la présence d'alcool se manifeste par une coloration verte (production de sulfate chromique).

Ces deux réactions ont été positives mais la quantité d'alcool produite, à en juger par le précipité d'iodoforme, est minime. L'alcool ne se produit qu'en anaérobiose.

Résumé

L'oxygène de l'air n'est pas nécessaire au développement de la Torule, mais la viscosité est beaucoup plus accentuée en culture aérobie ; d'autre part, la reversibilité du phénomène visqueux apparaît plus vite en l'absence d'oxygène.

Dans les deux cas il y a production d'un faible dégagement de gaz carbonique.

Enfin la Torule produit, en culture anaérobie seulement, une petite quantité d'alcool.

2) ACTION DE LA TEMPÉRATURE

A) *Le froid*

Nous avons obtenu au moyen de mélanges réfrigérants appropriés (chlorure de sodium, sels ammoniacaux et glace) des froids de -20 à -25° .

Le bouillon était pris en masse, nous avons pu laisser une dizaine de jours, les germes à des températures inférieures à -15° .

La Torule ne cultive pas à ces températures.

Si l'action du froid vient à cesser et que la Torule se trouve replacée dans des conditions favorables ($+25^{\circ}$ ou $+30^{\circ}$ par exemple), la viscosité se reproduit. Viscosité moindre cependant que celle d'un témoin n'ayant pas subi l'atteinte du froid.

Une culture visqueuse brusquement soumise à une température inférieure à $+5^{\circ}$ est frappée d'arrêt dans son développement.

De $+5^{\circ}$ à $+10^{\circ}$ la Torule végète, l'augmentation de viscosité n'est pas sensible.

Le dépôt floclé, examiné au microscope, montre de petites levures rondes souvent accolées en réseaux dont les mailles sont très petites.

B) *La chaleur*

Nous avons adopté comme température mortelle celle dont la caractéristique a été donnée par Meissner: une température qui agissant pendant cinq jours tue le microorganisme.

Cette température est déterminée par tâtonnements

à partir de 40°. On prépare un tube de bouillon sucré, on ensemence, si la viscosité se produit, on essaie un autre tube à 45°, etc...

La température optimum est celle qui réalise dans le temps le plus court, la plus belle culture.

On arrive à la déterminer en soumettant un certain nombre de milieux, à des températures différentes, pendant un même temps et en comparant les degrés viscosimétriques de ces milieux ramenés à + 15°.

La température mortelle est 50°, 51° environ.

La température optimum 32°, 33°.

La viscosité cesse de se produire vers 45°.

En résumé, la fermentation visqueuse causée par la Torule, se produit de + 10° à + 45°.

3°) ACTION DE LA LUMIÈRE (1)

Deux séries d'essais ont été effectuées pour chaque ferment, une première série en juin comprenait :

1^{re} Série. — 1) Des tubes placés sur une fenêtre ensoleillée.

2) Des tubes placés en sous-sol en demi-obscurité.

3) Des tubes placés dans une chambre photographique à vitrage rouge.

2^e Série. — Faite en octobre comprenant 3 groupes identiques à la première série.

Dans ces deux séries d'essais, les tubes ont été soumis à la même température. Les tubes du sous-sol et de la chambre photographique sont placés au bain-marie, leur température est réglée sur la température de la série extérieure.

(1) Nous avons entrepris cette recherche parce que Meissner en fait état dans son travail.

Les tubes des 2 séries et des 3 groupes contenaient de belles cultures visqueuses, mais les milieux placés en sous-sol, en demi-obscurité, étaient les plus visqueux. La différence faible était surtout notable avec les milieux placés au soleil.

Comme Meissner, nous avons été ainsi amenés à conclure à l'influence favorisante de la demi-obscurité, bien que les degrés viscosimétriques constatés fussent peu différents.

4) ACTION DE LA DESSICCATION

La Torule exige certaines conditions d'humidité ; cependant à l'abri de sa glaire elle résiste bien à la dessiccation.

Pour mettre ce fait en évidence, on aspire un peu de glaire dans un tube effilé stérilisé. A l'étuve à 37°, la glaire se transforme peu à peu en une pellicule blanche et molle.

Après huit jours d'étuve, le germe est réensemencé sur bouillon, il donne une maigre culture à peine visqueuse.

Si l'on soumet à nouveau la levure à la dessiccation, à l'étuve à 37°, le germe devient incapable de reproduire une culture sur carotte ou bouillon sucré.

La Torule résiste à la dessiccation pendant une dizaine de jours.

5) ACTION DU pH DU MILIEU, A 25°

Remarquons d'abord que la Torule cultive en milieu acide, l'acidité de la limonade visqueuse initiale était d'environ 1 % d'acide tartrique : $\text{pH} = 2,8$.

Les germes visqueux de Kayser et Manceau, les Torules de Meissner et de Guyot, les bacilles de Van Laër, sont non seulement acidophiles, mais producteurs d'acidité.

Nous avons recherché :

a) les pH limites et le pH optimum.

b) les modifications du pH causés par la Torule.

Les milieux employés pour ces études ont été d'abord :

Le bouillon peptoné sucré (saccharose), puis le liquide de Hansen n° 1 à 10 % de saccharose et 1 % de peptone.

Nous avons dû abandonner le bouillon sucré, dont la réaction, pour les $\text{pH} > 6$, est rapidement modifiée par le gaz carbonique de l'air.

Pour la détermination des pH, nous avons utilisé les échelles colorimétriques suivantes, fournies par les établissements Kühlmann :

pH : 1,2 à 2,8 Thymol sulfone phtaléine

pH : 2,8 à 4,6 Bromophénol bleu

pH : 5,2 à 6,8 Bromocrésol pourpre

pH : 6,6 à 8 Phénol sulfone phtaléine

pH : 7,2 à 8,8 Crésol sulfone phtaléine

pH : 8 à 9,6 Thymol sulfone phtaléine

a) pH limites et pH optimum

Nous avons préparé une série de milieu de pH différents :

pH = 1,67 — pH = 2,2 — pH = 3,25 — pH = 3,9
pH = 4,5 — pH = 6,1 — pH = 7,17 — pH = 7,8
pH = 8,8 — pH = 9,5

Nous avons obtenu des cultures dans tous ces milieux et résumé les résultats par le tableau ci-dessous. La viscosité des milieux a été mesurée au moyen du compte-goutte capillaire précédemment employé pour l'étude du lait. Le procédé de Van Laër

exige pour chaque essai une quantité de liquide trop considérable.

Le degré viscosimétrique est défini par le nombre de secondes qu'il faut pour s'écouler, dans un compte-goutte officinal, à 1 cc. de liquide.

TEMPS D'ÉCOULEMENT	Avant ensemencement	Après 7 jours	14 jours	21 jours	1 mois
pH des milieux :					
1,67	9'	12	15	13	13
2,2	9	17	23	20	18
3,25	9	19	27	32	28
4,5	9	20	29	36	33
6,1	10	18	26	33	31
7,17	18	17	25	30	29
7,8	10	17	24	29	28
8,8	10	15	22	27	27
9,5	10	13	18	23	27

En résumé la *Torule* ne cultive pas dans des milieux dont le pH < 1,5.

Il nous a été impossible d'établir l'autre limite, car le milieu ensemencé devient rapidement acide.

Enfin le pH initial optimum se trouve environ vers 4,5.

Modifications du pH du milieu

B) Acidification du milieu

Nous avonsensemencé un milieu neutralisé en présence de phénolphtaléine.

La fermentation visqueuse se produit et l'acidité se développe rapidement. Après un mois de culture à 25°, il faut pour neutraliser 10 cc. de milieu visqueux 1 cc., 5 de solution de soude N/10, ce qui correspond à 1 gr. 35 par litre d'acide lactique ou 1 gr. 125 d'acide tartrique par litre.

Le gaz carbonique empêche de saisir exactement le point du virage de l'indicateur, aussi avons nous fait bouillir le liquide visqueux à examiner dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux.

L'acidité produite varie suivant la réaction initiale du milieu :

pH = 1,67 : acidité constante

pH = 2,2 : acidité constante

pH = 3,25 : acidité constante

pH initial = 4,5	—	pH après un mois de culture à 25° :	4,25
pH — = 6,1	—	pH —	: 4,4
pH — = 7,17	—	pH —	: 4,6
pH — = 7,8	—	pH —	: 4,5
pH — = 8,8	—	pH —	: 4,8
pH — = 9,5	—	pH —	: 5,2

On obtient des résultats analogues en remplaçant le saccharose par le glucose.

Il n'est pas de même si, dans le liquide de Hansen on remplace la peptone par certains corps azotés tels que l'urée, le tartrate d'ammonium, l'asparagine et le succinate d'ammonium.

Urée.

pH initial = 7,8 — après un mois de cult. : pH = 4,2
Viscosité = 10 *Ib.* viscosité = 34

Tartrate d'ammonium.

pH initial = 5,6 — après un mois de cult. : pH = 3,3
Viscosité = 10 *Ib.* viscosité = 30

Asparagine.

pH initial = 7,2 — après un mois de cult. : pH = 5,2
Viscosité = 10 *Ib.* viscosité = 42

Succinate d'ammonium.

pH initial = 6,1 — après un mois de cult. : pH = 3,8
Viscosité = 10 *Ib.* viscosité = 32

Enfin notons que la rapidité de l'interversion du saccharose varie suivant la réaction du milieu, ce qui était à prévoir.

SACCHAROSE EN SOLUTION	Après 7 jours	14 jours	21 jours	1 mois
pH = 4,67 (milieu stérilisé à la bougie)	Tout le saccharose est interverti			
pH = 3,25	Il reste 1/4 du saccha- rose initial	Saccharose totalement interverti		
pH = 6,1	4/5 <i>Ib.</i>	1/2	1/4	1/8
pH = 8,8	9/10 <i>Ib.</i>	4/5	3/4	2/3
pH = 9 5	Traces de sucre réducteur	6/7	5/6	4/5

6) ACTION DU CALCIUM

D'après Bordet et Renaux (loc. cit.), l'oxalate exerce une influence très favorisante sur la production de la matière glaireuse dans des cultures de charbon.

Nous avons préparé des géloses calcifiées et oxalâtées selon les indications de ces auteurs.

La Toruleensemencée sur ces milieux produit des cultures visqueuses sur les deux séries de gélose.

Nous n'avons pas obtenu de différence, après plusieurs repiquages, entre ces deux séries de milieux.

7) ACTION DES ANTISEPTIQUES

a) *Le chlore*

Nous avons préparé une solution contenant 77 milligrammes de chlore par litre, sous forme d'hypochlorite.

A 10 cc. de bouillon sucré contenu dans chaque tube on ajoute les quantités ci-dessous de cette solution :

Tubes n° I, 0 cc. 2 ; n° II, 0 cc. 4 ; n° III, 0 cc. 6 ; n° IV, 0 cc. 8 ; n° V, 1 cc.

Ces cinq tubes présentaient de belles cultures.

Conformément aux conseils de M. le Professeur Lutz, nous mettant en défiance vis-à-vis de l'adaptation des levures à l'antiseptique, au lieu d'ajouter à nouveau du chlore dans ces tubes, nous avons fait une nouvelle série d'essais.

La nouvelle solution de chlore titrait 560 milligr. de chlore par litre. Cette nouvelle série d'essais était de dix tubes (1).

Tubes n° I contenant 0 cc., 5 de solution ; n° II, 1 cc. ; n° III, 1 cc. 2 ; n° IV, 1 cc. 4 ; n° V, 1 cc. 5 ;

(1) Après un mois de culture, cette solution ne titrait plus que 340 milligr. de chlore.

n° VI, 1 cc. 6 ; n° VII, 1 cc. 7 ; n° VIII, 1cc. 8 ; n° IX, 1 cc. 9 ; n° X, 2 cc. de la nouvelle solution.

A partir du tube VII, la Torule ne pousse plus.

Quelques gouttes des tubes V et VIensemencées sur milieu favorable, donnent de maigres cultures, à peine visqueuse.

La Torule est donc tuée dans les milieux contenant de 9 à 10 centigr. de chlore par litre. Cette dose de chlore est considérable.

Mais le chlore se combine avec la matière organique du bouillon. Le dosage du chlore libre a été effectué un mois après ensemencement : C'est ainsi que le tube n° II, titre seulement 38 milligr. de chlore libre par litre, au lieu de 56 ; le tube n° V, 50 milligr., au lieu de 79 ; le tube n° VII, 66 milligr., au lieu de 95.

Une troisième série de milieux contenant une solution d'antiseptique de titre différent, est venue contrôler ces constatations.

b) *L'acide sulfureux*

Nous avons préparé une solution de gaz sulfureux contenant 3 gr. d'anhydride sulfureux par litre (1 cc. = 3 milligrammes).

On ajoute à 10 cc. de bouillon sucré stérilisé les quantités suivantes : n° I, 0 cc. 5 ; n° II, 0 cc. 8 ; n° III, 1 cc.; n° IV, 1 cc. 2 ; n° V, 1 cc. 4 ; n° VI, 1 cc. 6 ; n° VII, 2 cc. ; n° VIII, 2 cc. 2.

Le tube n° VI est le tube limite, il contient sensiblement 500 milligr. d'anhydride sulfureux par litre.

Cette dose est à rapprocher de celles données par Meissner, Kayser et Manceau : Ces auteurs expriment la quantité d'antiseptique en bisulfite et métabisulfite ; Meissner donne comme dose maximum : 1 gr. de bisulfite par litre ; Kayser et Manceau, 0 gr. 50 de métabisulfite.

c) *L'acide salicylique*

Cet antiseptique est employé en solution dans du bouillon sucré. La Toruleensemencée dans ce milieu fournit des cultures visqueuses. Elle est tuée par 1 % d'acide salicylique.

d) *Le fluorure de sodium*

Ce sel employé en solution à 1 % n'empêche pas la fermentation visqueuse.

e) *Le tanin*

Les premiers auteurs qui étudièrent les vins filants attribuèrent au tanin le pouvoir d'empêcher les fermentations visqueuses. Comme l'ont observé Kayser et Manceau, l'influence antiseptique du tanin a été exagérée.

Nous avons préparé des milieux (bouillon sucré) additionnés de 3 0/00 de tanin, qui ont donné de belles cultures visqueuses. Nous avons ensuite augmenté progressivement la dose de tanin.

La Torule supporte 1 % de tanin.

Sous l'influence de cet antiseptique, il se produit un dépôt floconneux assez abondant.

Une solution de tanin introduit dans un tube de bouillon visqueux produit un précipité.

En résumé, le tanin précipite partiellement la glaire, mais son action antiseptique ne mérite pas d'être retenue. Le liquide reste visqueux.

CHAPITRE IV

Modifications que la fermentation visqueuse fait subir au milieu

Van Laër avait déjà remarqué l'augmentation d'acidité du milieu sous l'influence des fermentations visqueuses.

Mais l'étude détaillée de ces modifications est due à Kayser et Manceau. Ces auteurs les observent dans trois milieux :

Eau de touraillons
Solution de sucre peptoné
Bouillon de haricots.

Les modifications notées portent sur: l'acidité totale, l'azote total, les matières réductrices en glucose et l'extrait desséché à 100°.

L'acidité totale augmente de façon variable suivant les ferments et sucres utilisés.

Le sucre est consommé également de façon différente suivant qu'on s'adresse à différents germes, ou suivant la matière des produits azotés employés. La quantité d'azote varie peu, sauf sur bouillon peptoné où certains ferments produisent de l'ammoniaque.

Guyot recherche le sucre interverti et les proportions de glucose et lévulose formées.

Nous avons étudié :

1) L'action des ferments sur l'azote total.

- 2) L'action des ferments sur les sucres en solution.
- 3) La production d'acides organiques par le ferment.

1) MODIFICATIONS QUE LE FERMENT FAIT SUBIR
A L'AZOTE DU MILIEU

Les dosages d'azote ont été effectués par la méthode de Kjeldahl, modifiée par Denigès.

Nous avons réalisé deux séries d'essais :

- a) Avec du bouillon peptoné, sucré, stérilisé ;
- b) Avec du bouillon sucré, visqueux ayant subi la fermentation pendant : 1) une semaine, 2) un mois.

Les résultats obtenus ne montrent pas de perte sensible d'azote.

2) MODIFICATIONS PRODUITES PAR LE FERMENT
SUR LE SUCRE EN SOLUTION

Technique. — On dose le sucre avant et après fermentation :

a) par la liqueur de Fehling (20cc. de cette liqueur correspondent à 0 gr. 10 de glucose) ;

b) par examen polarimétrique de la solution en utilisant la formule

$$\alpha_D = \frac{AV}{\lambda p}$$

La technique suivie dans ces recherches est donnée par François (Manipulations de chimie analytique).

Les milieux employés sont :

- A) Le bouillon peptoné sucré.
- B) Le sucre en solution aqueuse.
- C) La limonade.

A) *Bouillon peptoné sucré.* — $pH = 7,8$. —

1) *Avant fermentation.* — Le bouillon étant stérilisé, on s'assure que le saccharose n'a pas été interverti. On décolore ensuite le bouillon au noir animal, puis on examine le liquide au polarimètre, la déviation est de $+ 9^{\circ} 50'$, ce qui correspond à 7 gr. 30 de sucre pour 100 cc. de solution.

2) *Après fermentation.* — Le bouillon, ensemencé de *Torule*, est laissé un mois en fermentation : il s'y développe une belle viscosité (1). La filtration du liquide visqueux est impossible, aussi sépare-t-on la glaire du bouillon par centrifugation au moyen d'appareils électriques puissants.

La glaire se rassemble dans le fond du tube, il suffit de décantier le liquide pour le séparer.

La solution décantée a perdu sa viscosité, elle est limpide, mais colorée en jaune foncé, on la décolore au noir animal. Puis on examine au polarimètre. On note une déviation négative $A = - 1^{\circ} 50'$.

Dans cette même liqueur on dose le sucre réducteur total p, au moyen de la liqueur de Fehling.

$p = 3$ gr. de sucre réducteur pour 100 cc. de solution (3 cc. 2 de liquide décolorant, 20 cc. de réactif).

*Intervention du saccharose non attaqué. —
Sucre consommé*

On produit l'hydrolyse complète du sucre non attaqué en faisant bouillir pendant 10 minutes la solution décantée et décolorée avec 5 % d'acide chlorhydrique.

On rétablit le volume primitif après manipulation.

(1) Nous avons tenu compte de la concentration subie par les milieux après un mois d'étuve.

La nouvelle déviation du polarimètre est cette fois

$$A' = - 7^{\circ} 4'$$

Le poids total $p' = 6,25$ (poids exprimé en glucose).

Il faut 1 cc. 6 de liquide pour réduire 20 cc. de liqueur de Fehling. Le poids p' en saccharose est :

$$p' \times 0,95 = 6,25 \times 0,95 = 5,93$$

Sucre consommé en un mois : $7,30 - 5,93 = 1 \text{ gr. } 37$.

Proportion de glucose et lévulose formés

Nature du sucre consommé

Soit x le poids du glucose ; y le poids du lévulose ;
 z celui du saccharose.

1) Une première égalité exprime que le poids p des sucres réducteurs est égal à la somme des poids glucose et lévulose formés.

$$x + y = p \qquad x + y = 3$$

2) Une deuxième égalité exprime que la déviation polarimétrique A est égale à la somme des déviations dues au glucose, lévulose et saccharose, dont les pouvoirs réducteurs sont les suivants :

$$\text{glucose } \alpha_D = 52,81$$

$$\text{lévulose } \alpha_D' = - 103^{\circ}4 - 0,56 t + 0,108 p'$$

Dans cette expression on peut négliger $0,108 p'$ la température est de $+15^{\circ}$

$$\alpha_D' = - 95^{\circ}$$

$$\text{saccharose } \alpha_D'' = + 66,64$$

λ la longueur du tube polarimétrique est de 2 décimètres.

V le volume est 100 cc.

La deuxième égalité est donc :

$$A = \frac{\alpha \lambda x + \alpha' \lambda y + \alpha'' \lambda z}{100}$$

3) Enfin dans la troisième expression, la déviation A' après interversion est la somme des déviations glucose, lévulose et sucre interverti, lequel a pour pouvoir rotatoire la somme des pouvoirs rotatoires lévulose, glucose, divisée par 2 et pour poids celui du saccharose, divisé par 0,95.

De ces trois expressions on tire la valeur de :

$$z = \frac{190 (A - A')}{\lambda [(1,90 \alpha) - (\alpha' + \alpha'')]}$$

$$\text{soit : } z = \frac{190 (1,50 - 1,06)}{2 [(1,90 \times 66,64) - (52,81 - 95)]} = 3 \text{ g. } 12$$

Saccharose non interverti = 3 gr. 12

$$x = \frac{100 A - \lambda (\alpha' p + \alpha'' z)}{\lambda (\alpha - \alpha')}$$

soit :

$$x = \frac{100 \times 1,50 - [2(-95 \times 3 + 66,64 \times 3,12)]}{2 (52,81 + 95)} = 1 \text{ g. } 93$$

Glucose en solution = 1,03

y = 3 gr. — 1 = 2 gr. sensiblement,

en réalité 1 gr. 97

Lévulose en solution = 1 gr. 97

En résumé on constate :

1) Que, comme il avait été déjà noté dans l'étude des sucres: la Torule secrète de l'invertine.

2) Qu'en faisant la somme des poids du glucose lévulose et saccharose, on arrive à la valeur de p' = 5 gr. 97 au lieu de 7 gr. 30, le sucre consommé est donc 1 gr. 33.

3) Que le sucre consommé a été surtout du glucose: sur 1 gr. 33 de saccharose disparu équivalent de 1,40 de sucre réducteur plus de 1 gr. a été consommé à l'état de glucose.

B) *Simple solution sucrée.* — $pH = 7$

Nous avons suivi l'altération d'une solution sucrée pendant un an. Avant ensemencement, la déviation de cette solution était de $10^{\circ} 36'$, ce qui correspondait à 8 % de saccharose.

Deux mois après ensemencement, la déviation était lévogyre — $1^{\circ} 44'$, après un an environ la déviation était $A = -2^{\circ} 30'$.

Le sucre réducteur, un an après ensemencement, était devenu $p = 4$ %.

La déviation après inversion était $A' = -4^{\circ} 15'$.

De ces données nous avons tiré :

Saccharose non interverti en solution : $z = 1$ %

Glucose formé après un an : $x = 1,3$ %

Lévulose formé après un an : $y = 2,7$ %

Le saccharose consommé est sensiblement égal à 3 gr. Le sucre consommé l'est, surtout, à l'état de glucose mais le lévulose est attaqué aussi par la Torule.

C) *La limonade.* — $pH = 2,8$

La limonade a subi pendant deux ans environ la présence de la Torule. Nous avons neutralisé.

Les déviations polarimétriques avant et après intervention étaient identiques : — $4^{\circ} 60'$.

De même le sucre réducteur, dosé à la liqueur de Fehling, était avant et après interversion : 3 gr. 33 %.

Glucose en solution = 0,60 % de limonade

Lévulose en solution = 2,70 % de limonade

Résumé

Le saccharose est interverti, par la Torule, le glucose est consommé pour la plus grande partie, mais non exclusivement ; une petite quantité de lévulose est également consommée pendant la fermentation.

3) PRODUCTION D'ACIDES ORGANIQUES

La Torule produit de l'acidité. Nous avons recherché par tâtonnements les acides formés dans le bouillon sucré.

A) Acide formique

1) On chauffe un mélange à volumes égaux d'acide sulfurique et d'alcool, on doit obtenir une odeur de rhum.

2) On recherche encore l'acide formique par réduction à chaud de l'azotate d'argent.

3) On porte au bain marie bouillant dans un tube à essai quelques centimètres cubes d'une solution mercurique acide composée de :

Oxyde mercurique.....	5 gr.
Acide sulfurique pur....	20 gr.
Eau distillée	100 gr.

On mélange l'acide à l'eau, dans un matras et sans refroidir, on ajoute l'oxyde en agitant, la dissolution se fait rapidement, surtout si on a soin de chauffer. On filtre. Ce réactif se conserve bien.

En présence d'acide formique il y a réduction du sulfate mercurique en sulfate mercurieux, dont, les formes cristallines examinées au microscope, rappellent une arête de poisson ou une feuille de fougères.

Cette réaction de Denigès est spécifique.

Nous avons pu constater la présence d'acide formique dans les cultures visqueuses.

B) *Acide acétique*

On caractérise cet acide par la réaction du cacodyle.

On évapore le bouillon au bain-marie en présence de soude caustique. On prend une petite parcelle du résidu, environ 0 gr. 50, on dessèche, puis on chauffe au rouge avec un peu d'anhydride arsénieux, il se dégage des vapeurs de cacodyle, d'odeur caractéristique.

Cette réaction a été positive.

C) *Acide propionique*

Cet acide n'a pu être caractérisé.

D) *Acide butyrique*

Nous avons employé la réaction de Denigés, qui consiste à transformer l'acide butyrique en acide diacétique. Cet acide, en présence d'une solution de nitroprussiate de soude, donne une teinte qui varie, suivant les quantités d'acide, du rouge au rose.

Cette réaction a été négative.

E) *Acide lactique*

Cet acide a été trouvé dans le bouillon visqueux par Kayser et Manceau. Nous l'avons mis en évidence par la réaction de Berg : Une solution très étendue de perchlorure de fer, sensiblement incolore, tourne au jaune en présence d'acide lactique.

D'autre part, chauffée avec un peu de permanganate en milieu sulfurique, une solution lactique dégage de

l'aldéhyde, caractérisée par son odeur et la coloration brune qu'elle communique au réactif de Nessler.

F) *Acide oxalique*

On recherche cet acide en solution rendue alcaline par l'ammoniaque, on filtre, puis on traite par une solution de chlorure de calcium en présence d'acide acétique : il doit se produire un précipité insoluble dans les acides organiques, soluble dans les acides minéraux forts.

Cette réaction est négative.

G) *Acide succinique*

Nous avons essayé, en vain, de le caractériser par son anhydride.

H) *Acide tartrique*

Nous avons essayé la réaction de Fenton : on ajoute au bouillon visqueux quelques centimètres cubes de solution de sulfate ferreux, puis une ou deux gouttes d'eau oxygénée et un excès de soude, il doit se développer une coloration violette devenant presque noire.

Cette réaction a été négative.

I) *Acide malique*

La recherche de cet acide a été tentée au moyen de la réaction, qui consiste à le transformer en acide oxalacétique, caractérisé par son sel de mercure. Cette réaction a été encore négative.

Proportion d'acides formés les uns par rapport aux autres

Les acides formique, acétique et lactique ayant été

caractérisés, nous avons cherché dans quel rapport ils se trouvaient formés.

Nous avons soumis le bouillon visqueux à une distillation fractionnée, nous avons recueilli dans une solution de soude les produits qui passent au voisinage du point d'ébullition des divers acides.

La quantité d'acide formique distillée est très faible, c'est le seul résultat constant que nous ayons obtenu, les proportions des acides acétique et lactique sont trop variables pour pouvoir en faire état ; rappelons à ce sujet la conclusion prudente de Kayser et Manceau: « Les rapports, entre les produits acides, sont variables pour un même ferment. Ces rapports dépendent de la combinaison du milieu et des conditions de l'expérience ».

Résumé

L'acidité produite par la Torule est due surtout aux acides acétique et lactique provenant de l'oxydation des sucres.

CHAPITRE V

La substance glaireuse

La composition de la substance glaireuse est des plus incertaines.

Pasteur (loc. cit.), en 1886, déclare que la graisse des vins s'accompagne d'une sorte de gelée. En 1876, il attribue à cette gelée la composition élémentaire de la cellulose. Pour lui la difficulté réside dans son extraction et dans la petite quantité de glaire formée.

Béchamp (1) isole une substance blanche dans un liquide devenu visqueux. Comme Pasteur, il lui attribue la formule de la cellulose; il l'appelle viscosse.

Kramer (loc. cit.) (2) reconnaît que la glaire est constituée par un hydrate de carbone, formé par gonflement de la membrane des microorganismes, au dépens du sucre.

Bräutigam (3) étudiant un lait visqueux émet l'hypothèse de la formation d'un dextrane :

Adametz (loc. cit.) indique que la matière visqueuse se forme par gonflement de la membrane.

Happ (loc. cit.) reconnaît que le maltose et le saccharose sont indispensables pour la fermentation vis-

(1) BÉCHAMP : Sur la viscosse (*C. R. Acad. des Sc.*, t. LXXVIII, 1882).

(2) KRAMER : *loc. cit.* (Studien über die schleimige Gährung).

(3) BRAUTIGAM : Bildung des Dextrans (*Pharm. Cent. Halle für Deutsch*, 1892, XXXIII, 534).

queuse; il attribue la formule $C^6H^{10}O^5$ à la substance visqueuse et pense que le produit d'hydrolyse est le glucose.

D'autres auteurs : *Leishmann, Sato, Charrin et Desgrez, Konig* confirment les observations précédentes.

Van Laër (loc. cit.) affirme au contraire que la glaire est constituée par deux substances, « l'une de nature azotée, l'autre, soluble dans l'eau, de nature inconnue ».

Laborde (loc. cit.) en 1904, observe que cette glaire ne réduit pas la liqueur de Fehling, mais que par hydrolyse elle donne du glucose.

Kayser et Manceau (loc. cit.) envisagent trois hypothèses sur l'origine de la gelée : Celle-ci serait formée :

- 1) Aux dépens des hydrates de carbone.
- 2) Par gonflement de la membrane.
- 3) Aux dépens des substances azotées.

Kayser et Manceau optent pour la seconde hypothèse.

Fernbach et Schön (loc. cit.) ont observé la formation de lévulosane et de dextrane dans des liquides rendus visqueux par un *Leuconostoc*, auteur de la gomme des sucreries.

Guyot (loc. cit.) indique que la substance formée est un dextrane. Il note pour la glaire les caractères suivants :

- 1) Précipitation par l'alcool et le sous acétate de plomb.
- 2) Insolubilité dans l'eau à 100°.
- 2) Insolubilité dans les solutions légèrement alcalines.
- 4) Insolubilité dans la liqueur de Schweitzer.
- 5) Hydrolyse par les acides étendues et formation de glucose.

Nous allons étudier successivement :

1) Les moyens d'obtenir de grandes quantités de glaire.

2) La formation de la glaire : phénomènes physiques, chimiques, physiologiques qui président à sa formation.

3) Sa composition chimique. Ses produits d'hydrolyse.

1) MÉTHODE D'OBTENTION DE LA GLAIRE

Nous avons essayé de précipiter la glaire par l'alcool, nous n'avons pas réussi, le sous-acétate de plomb n'a pas donné meilleur résultat.

A) Un milieu nutritif convenable (bouillon avec 20 ou 30 % de saccharose) porté au voisinage de l'optimum 35°, se prend en une masse glaireuse semi-solide, en deux ou trois jours. Cette masse est délayée dans un peu d'eau, puis, centrifugée à plusieurs reprises, au moyen d'appareils puissants.

B) La carotte est le milieu de choix pour la Torule. On choisit des carottes de dimensions importantes dans lesquelles on coupe des tranches minces de 20 cm./10 cm., qu'on place dans de grands bocaux à larges goulots. On stérilise, on ensemeence en stries.

Après une huitaine de jours la carotte est couverte d'une masse glaireuse qu'on peut détacher avec une spatule.

La matière gluante est délayée dans l'eau puis centrifugée.

On obtient ainsi une matière hyaline, pouvant être concentrée au bain-marie, sa couleur est blanche, sa consistance celle d'un empois.

La glaire séparée du bouillon doit être traitée rapidement pour éviter le phénomène d'auto-digestion.

Ayant recueilli une certaine quantité de masse glaireuse et l'ayant laissée séjourner dans une éprouvette graduée stérile, nous avons constaté au bout de quelques jours une diminution notable de la glaire. Un mois après, celle-ci avait totalement disparu, à sa place se trouvait un liquide jaunâtre, qui décoloré et examiné au polarimètre, donnait une déviation de $+ 7^{\circ}$, réduisait la liqueur de Fehling.

L'ozasone obtenue au moyen de ce liquide présentait les caractères de la glucosazone et la réaction de Berg était positive.

2) PHÉNOMÈNES PHYSIQUES ET CHIMIQUES PRÉSIDANT A LA FORMATION DE LA GLAIRE

A) *Phénomènes physiques.* — Van Laër a remarqué que l'agglutination des levures et des bactéries peut être déterminée par des agents chimiques. Ce phénomène se produirait avec des germes préalablement tués; c'est ainsi que le borax détermine l'agglutination de la levure tuée par l'alcool.

Nous avons observé en effet qu'un certain nombre d'électrolytes : (chlore, acide sulfureux, acide sulfurique, soude, borate de soude) déterminent la formation d'un dépôt visqueux.

Ce résultat n'est pas constant.

En effet, nous avonsensemencé du sirop de sucre de densité $d=1,32$, contenant quelques gouttes d'acide sulfurique N/10. Le siropensemencé acquiert peu à peu une grande viscosité, à tel point qu'il coule difficilement dans le tube.

Il reste clair néanmoins; aucun dépôt, aucune floculation ne se produit.

Nous avons observé, par la suite, que la floculation ne se produit pas dans un liquide dont la densité est supérieure à 1,25.

La densité du liquide joue donc un rôle dans la floculation de la glaire.

B) *Phénomènes chimiques.* — *Transformations chimiques de la membrane des germes visqueux.* — Pour Guilliermond (1), la floculation est un phénomène très complexe correspondant à un changement dans la constitution chimique de la membrane qui devient visqueuse.

Van Tieghem (2), étudiant la glaire du *Leuconostoc*, est de cet avis; l'accolement des individus correspondrait pour lui au changement de la composition de la membrane.

Le désaccord des auteurs sur l'affinité pour les colorants, les colorations et la composition chimique des membranes visqueuses sont un appui à cette hypothèse.

Nous avons vérifié, que l'organisme tué, floculé en réseaux se colorait entièrement d'une manière aisée, par contre aucun colorant essayé n'a pu mettre en évidence l'hypertrophie de la membrane de la Torule vivante non floculée.

Colorations usuelles

Le bleu de méthylène. — La membrane de la Torule ne prend pas le bleu de méthylène, il est facile de s'en rendre compte en comparant et mesurant une préparation à l'encre de Burri et une préparation au bleu. Les Torules sur encre de Chine, mesurent de 10 à 12 μ , elles ne paraissent avoir que 4 à 8 μ quand elles sont colorées au bleu de méthylène.

On peut fixer par une solution alcoolique de sublimé ou mieux par une solution lactique et acétique.

(1) GUILLIERMOND : Les levures (*Encyclopédie scientifique*, Edit. Doin, 1911).

(2) VAN TIEGHEM : (*Ann. des Sc. nat.*, (6), 7, 180).

Les réseaux de Hansen se colorent par le bleu de méthylène, ainsi qu'il est indiqué page 29.

La fuchsine colore les réseaux en rose mais ne colore pas la membrane gonflée, le violet de gentiane associé à la fuchsine colore en bleu la cellule proprement dite, mais laisse incolore la partie extérieure.

Colorants des composés pectiques. — Bien que de composition chimique différente, ces composés ne sont pas sans analogie avec notre matière glaireuse. Ces composés acides prennent les colorants basiques.

Nous avons essayé le rouge de ruthénium en solution acétique à 1 %. Les réseaux sont colorés en rose, mais l'enveloppe extérieure de la Torule libre ne l'est pas.

Le rouge neutre. — Sur les conseils de M. le Professeur Lutz, nous avons essayé une solution de rouge neutre de Casella. Ce colorant donne de bons résultats pour les membranes dont l'hydrolyse donne des pentoses, mais pour la Torule nous n'avons rien observé.

Nous avons changé notre milieu d'observation en employant le lactophénol avec le Soudan III comme colorant, le résultat a été négatif.

Le triple colorant de Guéguen (Soudan III, Iode et bleu coton) a été essayé sans plus de succès.

L'Iode. — L'Iode ne colore pas la membrane. Nous avons essayé en outre la coloration de Will et Casagrandi.

On traite à chaud par l'acide chlorhydrique à 1 %, on lave, on dessèche, puis on colore à chaud avec le vert d'iode et la fuchsine. La membrane externe restée incolore, doit paraître entourée d'une fine couche violet rouge.

Nous n'avons pas observé de coloration.

Les colorants de la cellulose : rouge congo et hématoxyline n'ont pas été plus efficaces.

La liqueur de Fehling. — On injecte entre lame et lamelle quelques gouttes de liqueur de Fehling, une parcelle de glaire, on porte le tout à ébullition.

Si la membrane extérieure réduit la liqueur de Fehling il doit se former autour de chaque Torule, une auréole d'oxydure de cuivre.

Nous n'avons pas observé de réduction.

Le bleu de toluidine. — D'après Bordet et Renaud : « le bleu de toluidine colore la substance constitutive de la glaire charbonneuse en nuance rougeâtre, les articles engainés apparaissent au microscope comme de gros tronçons rouges dans l'axe desquels on distingue parfois assez malaisément le bâtonnet lui-même qui se teint en bleu ».

Nous n'avons pas observé, pour la Torule, d'autre teinte que la teinte bleu.

La méthode de Gutstein au tanin safranine n'a pas donné meilleur résultat.

Colorations vitales

Nous avons employé la méthode de Neisser : on colore un frottis quelques secondes avec un mélange de deux parties de la solution *a* et une partie de la solution *b*.

La solution *a* contient :

Bleu de méthylène médicinal pur	
pulvérisé R. A. L.	1 gr.
Alcool à 95°	20 cc.
Eau distillée	1.000 cc.
Acide acétique cristallisable.....	50 cc.

La solution *b* :

Alcool à 95°	10 cc.
Eau distillée	300 cc.

On lave ensuite à l'eau; puis on colore pendant 3 secondes avec une solution de chrysoïdine : 2 grammes chrysoïdine R. A. L. dissoute dans 300 cc. d'eau bouillante; cette solution est filtrée et refroidie. On lave encore à l'eau, on sèche à l'étude à 37°, on examine, les cellules paraissent colorées en jaune, elles sont limitées par une fine membrane bleue, mais la partie extérieure hypertrophiée est restée incolore.

Nous avons également essayé la technique suivante: On dépose dans une cellule de Nageotte : 1 goutte de liquide visqueux d'une culture récente et 1 goutte d'une solution de colorant à essayer, on mélange, on couvre d'une lamelle et on examine à l'objectif 7.

Le rouge neutre n'a pas été absorbé, les cellules sont restées incolores. Par contre les cellules et leur membrane normale ont retenu le bleu de méthylène mais la partie hypertrophiée est demeurée invulnérable.

Résumé

Aux transformations chimiques du milieu correspondent des transformations chimiques de la membrane. Nous en avons observé trois pour la Torule.

1) *Membrane normale* se colorant en bleu intense par le bleu de méthylène et le bleu de toluidine, cette membrane est très fine, elle est surtout visible dans les tubes de milieux non visqueux ou peu visqueux. Les Torules mises en évidence par la méthode de Gins et celles colorées au bleu de méthylène ont les mêmes dimensions.

2) *Membrane extérieure.* — Mise en évidence par la méthode de Gins, cette membrane n'a pu être colorée.

Les dimensions d'une Torule avec membrane extérieure sont 10 à 18 μ . Le corps central n'a que de 4

à 8 μ . Le milieu est très visqueux, il n'y a pas eu de floculation.

3) *Membranes fusionnées en zooglées (réseaux de Hansen)*. — Comme l'indique Van Tieghem, ce sont des masses d'individus accolés qui constituent les zooglées. Ces individus ont fusionné leur membrane hypertrophiée. Celle-ci prend la fuchsine mais retient mal le bleu de méthylène. Les dimensions des mailles du réseau sont de 4 à 6 μ . On trouve ces réseaux dans les cultures visqueuses anciennes et les dépôts visqueux.

3) COMPOSITION CHIMIQUE DE LA GLAIRE

Nous avons entrepris les recherches suivantes :

a) Dosage de l'azote total.

b) Hydrolyse de la glaire. — Recherche et identification du sucre formé.

A) Azote total

1) *Mucus recueilli dans le bouillon*. — L'azote total a été dosé par la méthode Kjeldahl. On part de cinquante centigrammes de glaire essorée et délayée dans 10 cc. d'eau distillée; pour cette quantité de glaire l'azote dégagé a été de 1 cc., en poids 1 milligr. 14.

2) *Mucus recueilli sur carotte*. — Une quantité identique de glaire dégage 0 cc. 6 d'azote, soit en poids 0 milligr. 84.

Le bouillon est azoté et la glaire essorée et lavée en a retenu mécaniquement, ce qui explique ces résultats discordants.

B) *Hydrolyse de la glaire*

Dans un ballon de 250 cc. surmonté d'un réfrigérant à reflux, on introduit environ 3 gr. de matière glaireuse essorée provenant du bouillon. On délaye la glaire dans 50 cc. d'eau distillée; on ajoute 5 cc. d'acide chlorhydrique pur. On chauffe plusieurs heures à feu doux. La glaire entre peu à peu en solution.

On laisse refroidir, on complète à 50 cc., la liqueur acide est jaune, dans le ballon il reste un léger dépôt. On examine, au polarimètre, la solution filtrée et décolorée; la déviation est $1^{\circ}24'$. Le liquide réduit aussi la liqueur de Fehling (7 cc. = 20 cc. de liqueur), ce qui représente 1 gr. 40 % de sucre exprimé en glucose.

Une solution, provenant de l'hydrolyse de 6 gr. de glaire essorée, obtenue sur carotte, donne au polarimètre une déviation de $+ 3^{\circ}10'$. 30 cc. 2 de cette solution réduisent 20 cc. de liqueur de Fehling. Ce qui correspond à 3 gr. 10 de sucre exprimé en glucose.

Identification du sucre formé

Par évaporation au bain-marie de la solution provenant de l'hydrolyse de la glaire, nous avons obtenu quelques grammes d'une matière brunâtre.

Nous avons soumis cette substance sucrée, afin de l'identifier, aux essais indiqués par Rodillon, résumés dans un tableau donné par Perrot (1).

1) Un fragment de sucre avec de l'acide chlorhydrique pur renfermant un millième d'orcine, donne une coloration rouge orange. Le sucre cherché est un hexose.

2) On soumet cinq centigrammes de sucre à l'action de l'eau bromée et on traite par le réactif de Berg.

(1) PERROT : *Contribution à l'étude des Crustacés décapodes* (Thèse Doct. Univ. Pharm., Paris, 1927).

(On obtient de l'acide glycuronique qui donne la réaction des acides alcools et colore en jaune le réactif de Berg.) Cette réaction a été également positive.

Nous avons déterminé le pouvoir rotatoire, la forme cristalline de l'osazone et son point de fusion, afin de différencier le sucre cherché.

a) *Pouvoir rotatoire.* — On applique la formule

$$\frac{AV}{\lambda p} = \alpha_D$$

α_D , pouvoir rotatoire spécifique.

p, poids de sucre réducteur donné par la liqueur de Fehling.

A, déviation observée au polarimètre.

Mucus provenant du bouillon. —

$$A = 1,40, \quad p = \frac{10}{7}, \quad V = 100, \quad \lambda = 2$$

$$\alpha_D = \frac{1,40 \times 100}{2 \times \frac{10}{7}} = + 49^{\circ}$$

Mucus provenant de la carotte. —

$$A = 3,10 \quad p = \frac{10}{3,2}, \quad V = 100, \quad \lambda = 2$$

$$\alpha_D = \frac{3,16 \times 100}{\frac{10}{3,2} \times 2} = + 50^{\circ}56$$

Le pouvoir rotatoire du glucose est

$$\alpha_D = + 52,81$$

b) *Osazone.* — On prépare l'osazone par la méthode de Denigès, après avoir déféqué avec le réactif de Patein. Les cristaux obtenus avaient la forme d'aiguilles groupées autour d'un centre.

On sait qu'à ce type d'osazones correspondent deux sucres aldéhydiques (glucose et mannose) et un sucre cétonique (lévulose).

Le point de fusion de l'osazone est 228°, celui de la glucosazone : 232°.

Enfin, pour contrôler nos résultats, nous avons essayé les réactions de Bial et de Sélivanof.

a) *Réaction de Bial.* — Le réactif est ainsi composé :

Acide chlorhydrique pur....	50 cc.
Orcine	0 gr. 10
Perchlorure de fer anhydre..	II gouttes

On ajoute dans un tube 6 cc. de réactif, on porte à ébullition, on éloigne le feu et on ajoute immédiatement V gouttes de solution de sucre.

Nous avons obtenu la coloration jaune pâle caractéristique du glucose.

b) *Réaction de Sélivanof.* — On peut s'assurer de l'absence du lévulose en effectuant la réaction de Sélivanof (réactif sulforésorcinique) :

Résorcine	2 gr.
Eau	100 cc.
Acide sulfurique	1/2 cc.

On défèque par la solution de Patein, on ajoute 2 cc. d'acide chlorhydrique concentré, on mélange 2 cc. de solution déféquée avec 2 cc. de solution sulforésorcinique, on porte au bain-marie bouillant, la présence du lévulose est décélée par une coloration rouge intense.

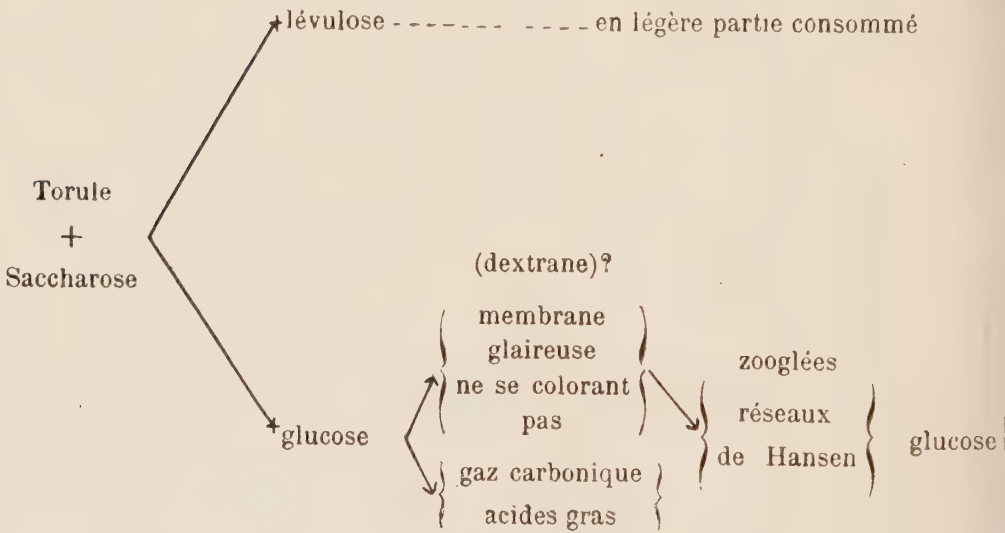
Cette réaction a été négative.

Le sucre obtenu par hydrolyse de la glaire est donc du glucose.

Conclusion

La glaire de la Torule donne du glucose par hydrolyse. La partie mucilagineuse de cette glaire est donc vraisemblablement un dextrane.

Nous pouvons résumer l'action de la Torule sur le saccharose de la manière suivante :



DEUXIÈME PARTIE

Étude du ferment de la bière

CHAPITRE PREMIER

Étude morphologique

A) ORIGINE. — ISOLEMENT

Une dilution de bière visqueuse a été portée dans une boîte de Roux. Nous avons obtenu deux séries de colonies, les unes jaunâtres et visqueuses, les autres blanches et non visqueuses. Repiquant les premières sur gélose inclinée nous avons obtenu un bacille qui présente certaines analogies avec ceux de Van Laër.

Ce bacille se cultive très bien sur gélose glucosée, on peut utiliser cette propriété pour le séparer.

B) MORPHOLOGIE

Le bacille est grêle : long de $1\ \mu$ 5 à $2\ \mu$ 4 sur 0,6 à 0,8 de large.

Il se présente le plus souvent isolé, quelquefois aggloméré en paquet, rarement en file; dans ce cas la chaîne constituée n'est jamais très longue.

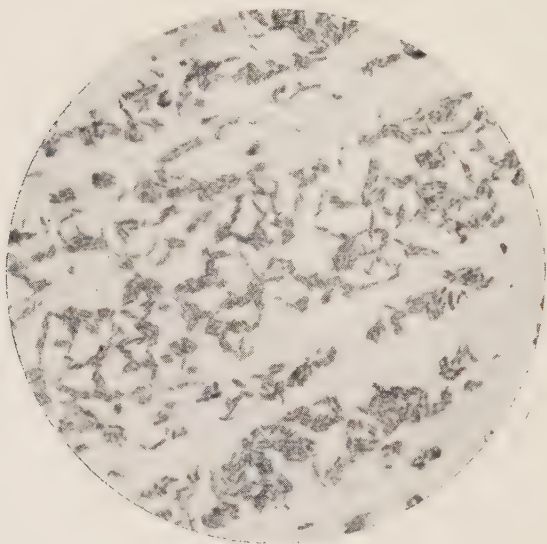


Fig. 6. — Bacille de la bière visqueuse (grossissement : 1.300)
(Culture sur gélose glucosée)

Ce bacille ne prend pas le Gram, n'est pas mobile, ne possède pas de cils, la gaine n'est apparente que sur fond noir.

Nous n'avons pas observé de sporulation.

Nous avons nommé le ferment de la bière visqueuse :
Bacille n° 1.

CHAPITRE II

Milieux de culture

1) MILIEUX USUELS

A) *Bouillon peptoné*. — Il se forme au bout de quelques jours un abondant dépôt constitué par une masse mucilagineuse, de couleur jaune d'or. Cette matière visqueuse examinée au microscope révèle de nombreux paquets de bacilles accolés.

L'odeur de la culture est légèrement désagréable et butyreuse.

B) *Gélose inclinée*. — Au début, on voit apparaître de petites taches jaune d'or et visqueuses, ces taches augmentent de volume, se rejoignent et arrivent à couvrir toute la surface de la gélose.

C) *Gélose à la bière*. — On suit le mode indiqué pour la *Torule*. La culture du bacille est favorisée par un peu de carbonate d'ammoniaque.

La colonie géante est une masse assez uniforme sans relief, la surface est craquelée. La culture est jaune d'or et visqueuse; elle devient jaune sale et se dessèche en vieillissant.

D) *Gélatine*. — Ce milieu n'est pas liquéfié par le bacille qui, ensemencé en piqûre, ne pousse pas en pro-

fondeur; à la surface les colonies visqueuses sont jaune d'or.

E) *Carotte*. — Un enduit jaunâtre finit par couvrir ce milieu. A mesure que la culture vieillit, l'enduit devient de plus en plus muqueux et glaireux ce qui donne aux colonies un aspect jaune sale.

Le liquide sous-jacent possède une viscosité moindre que dans le cas de la *Torule*.

F) *Betterave*. — Le bacille pousse mal sur betterave, les colonies ont le même aspect que sur carotte. Par contre, le liquide sous-jacent est plus visqueux et donne avec le temps un dépôt jaunâtre.

G) *Pomme de terre*. — A la base de la tranche, il se forme une plage jaune brun de peu d'étendue. Le liquide sous-jacent est à peine visqueux.

H) *Liquide de Hansen et Liquide de Pasteur*. — Ces milieux, celui de Hansen surtout, conviennent assez bien au bacille.

2) ETUDE DES SUCRES, ALCOOLS POLYATOMIQUES ET HYDRATES DE CARBONE

Comme pour la *Torule*, ces substances ont été étudiées :

- 1) Dans du bouillon peptoné salé;
- 2) Dans du liquide de Hansen n° 1;
- 3) En simple solution dans l'eau.

1) *Milieux au bouillon peptoné avec:*

A) *Saccharose*. — Ce milieu convient bien au bacille qui lui communique une grande viscosité; il se forme rapidement un dépôt jaune et très visqueux.

Le saccharose est interverti et le milieu, de neutre, est devenu acide.

B) *Glucose*. — C'est un milieu de choix pour ce ferment. On observe même des viscosités plus grande que pour la Torule.

C) *Lévulose*. — Le bacille se comporte mieux que la Torule vis-à-vis de ce sucre.

D) *Mannose*. — La différence est également peu marquée, la viscosité un peu moindre.

E) *Maltose*. — La viscosité obtenue sur ce milieu était analogue à celle communiquée par le bacille, à l'eau lévulosée.

F) *Lactose et galactose*. — La viscosité des bouillons lactosé et galactosé reste très faible, elle ne diffère pas sensiblement de celle qu'on obtient avec le bouillon non sucré.

G) *Glycérine*. — Contrairement à la Torule, le bacille cultive mal sur ce milieu.

H) *Mannite*. — Cet alcool polyatomique convient mieux que la glycérine mais la viscosité observée reste faible. Il se forme un léger dépôt après une semaine de culture sur ce milieu.

I) *Dextrines*. — Le Bacille n° 1, comme la Torule, ne manifeste pas de préférence vis-à-vis des dextrines qui lui conviennent assez bien.

K) *Inuline*. — On obtient, avec cet hydrate de carbone, de maigres cultures, peu visqueuses.

L) *Amidon*. — Cet hydrate de carbone a été utilisé en décocté à 2 % dans le bouillon. Ce milieu devient très peu visqueux. On n'obtient aucune culture sur l'empois d'amidon.

2) Milieux au liquide de Hansen

Les résultats de cette étude ont été, ainsi qu'il a été fait pour la Torule, condensés dans le tableau ci-dessous.

DEGRÉS VISCOSIMÉTRIQUES A + 15°	Avant ensemencement	Après 4 jours	8 jours	15 jours	1 mois	2 mois
Liquide de Hansen sans sucre	17	22	22	22	21	20
Liq. de Hansen sans peptone + 10 0/0 glucose.	18	30	38	48	44	40
Liq. de Hansen + peptone + 2 0/0 glucose..	17	25	31	36	37	34
<i>Ib.</i> + 5 0/0 glucose....	18	28	34	43	43	39
<i>Ib.</i> + 10 0/0 glucose...	18	35	42	54	58	53
<i>Ib.</i> + 20 0/0 glucose...	19	40	55	68	76	70
<i>Ib.</i> + 10 0/0 saccharose	18	33	39	45	52	47
<i>Ib.</i> + 10 0/0 lévulose ..	18	29	33	36	34	32
<i>Ib.</i> + 10 0/0 mannose .	18	28	31	34	32	32
<i>Ib.</i> + 10 0/0 maltose ..	18	28	30	33	30	30
<i>Ib.</i> + 10 0/0 lactose ...	18	21	24	26	26	24
<i>Ib.</i> + 10 0/0 galactose .	18	21	22	24	22	22
<i>Ib.</i> + 10 0/0 glycérine.	18	22	26	28	25	25
<i>Ib.</i> + 10 0/0 mannite..	18	24	28	30	27	26
<i>Ib.</i> + 10 0/0 dextrine..	21	26	29	32	31	28
<i>Ib.</i> + 2 0/0 amidon....	19	22	23	26	25	23
<i>Ib.</i> + 10 0/0 inuline...	18	21	22	24	25	23

3) *Sucres, alcools polyatomiques, hydrates de carbone, en solution dans l'eau*

Les solutions de saccharose, glucose, lévulose mannose et maltose deviennent seules visqueuses.

La viscosité est, comme pour la Torule, proportionnelle à la quantité de substance en solution.

Un sirop de saccharose de densité $d=1,32$ perd peu à peu sa fluidité, il cesse de couler deux mois environ après ensemencement. La reversibilité se produit aussi plus lentement que pour la Torule, il faut plusieurs mois pour que le sirop ait repris en partie sa fluidité.

Le sirop incolore au début devient jaune foncé après plusieurs mois de culture.

Résumé

Le sucre est nécessaire à la fermentation visqueuse produite par le Bacille n° 1.

Tous les sucres, hydrates de carbone, alcools polyatomiques ne conviennent pas également. Le glucose et le saccharose sont les éléments de choix, viennent ensuite le lévulose, le mannose, le maltose, la dextrine, la mannite, la glycérine, l'amidon, l'inuline, le lactose et le galactose.

3) ETUDE DES MILIEUX AZOTÉS

Les peptones et l'albumine de l'œuf sont suffisants pour entretenir la vie du bacille. Les autres dérivés azotés ne peuvent le faire ; cependant ajoutés à un milieu nutritif, ils modifient la fermentation visqueuse. Ces résultats ont été obtenus de la même façon qu'il a été indiqué pour la Torule.

A) Etude de la peptone

Ce bacille est plus à l'aise que la *Torule* dans l'eau peptonée ; c'est en solution peptonée à 5 % qu'il donne le plus de viscosité au liquide, il se forme un dépôt jaune et mucilagineux au fond du tube. La culture possède une odeur désagréable butyreuse. Il y a production d'indol.

Nous avons résumé, dans le tableau ci-dessous, les résultats obtenus, en fonction des degrés viscosimétriques.

DEGRÉS VISCOSIMÉTRIQUES	avant ensemencement	4 jours après	8 jours	15 jours	1 mois	2 mois
Sol. peptone :						
1 0/0	16 1/2	22	22	22	21	20
2 0/0	17	22	23	24	22	21
5 0/0	17	22	24	26	24	22
10 0/0	17 1/2	21	23	24	23	20

B) Etude de l'albumine cuite

a) *Le chlorhydrate d'ammoniaque* retarde le germe dans son développement, mais l'action est moins marquée que pour la *Torule*.

b) *Le carbonate d'ammoniaque* a une influence favorable sur la viscosité du liquide.

c) *Le succinate* et le *tartrate* ont une influence analogue.

D) *Etude des nitrates*

L'action semble nulle.

E) *Etude des nitrites*

Leur présence dans le milieu affecte peu le bacille.
La Torule est bien plus sensible à leur action.

F) *Etude des amides*

L'action exercée par l'urée sur les cultures visqueuses du bacille est à rapprocher de l'action du carbonate d'ammoniaque.

G) *Etude des nitriles*

L'acide cyanhydrique a une influence néfaste.

A 1 0/00 la viscosité est à peine sensible, le bacille résiste jusqu'à 8 à 9 0/00, dose mortelle.

H) *Etude de l'ammoniaque et des amines*

A faibles doses (jusqu'à 0,5 %) ces corps favorisent la viscosité, mais au-delà de cette dose le contraire se produit.

I) *Etude des acides aminés*

Aux doses de 0,1 %, 0,5 %, 1 %, l'asparagine augmente la viscosité. Mais à partir de 2 % l'influence devient défavorable.

K) *Etude des amino-alcools*

Le chlorhydrate de choline jusqu'à dose de 1 % est bien toléré par le bacille.

Résumé

Cette étude succincte met en évidence :

L'action favorable à faibles doses des sels ammoniacaux à acide faible, des acides aminés, des acides amino-alcools.

L'action défavorable des sels ammoniacaux à acide fort, de l'acide cyanhydrique et des nitrites.

4) ETUDE DES MILIEUX NATURELS

A) Etude du lait

Un centimètre cube de lait stérilisé s'écoule en 19 secondes. Ensemencé avec le Bacille n° 1 la viscosité augmente ; au bout de quinze jours il faut 30 secondes pour qu'un centimètre cube de lait puisse s'écouler.

Après un mois, ce lait est transformé en une masse glaireuse jaunâtre.

L'acidité a augmenté, il faut à ce moment 1 cc. 8 de soude N/10 pour neutraliser 10 cc. de lait, soit 1 gr. 60 d'acide lactique par litre.

Comme pour la Torule nous n'avons pas constaté la formation de présure.

Pour le Bacille n° 1, il se fait une séparation dans la masse visqueuse, quelques jours après la coagulation du lait.

Un amas glaireux et jaunâtre se dépose au fond du tube. Ce dépôt est surmonté d'un liquide jaune à peine visqueux. Nous n'avons constaté par la suite, ni modification du caillot, ni sécrétion de caséase.

B) Etude du vin

Comme pour la Torule, plusieurs types de vin ont été étudiés.

a) *Vin blanc* 10°. — On obtient d'abord un léger trouble, puis le liquide devient visqueux. On observe par la suite un dépôt visqueux clair au fond du tube.

La viscosité de ce vin ne dépasse pas 25°, la réversibilité est peu marquée. Le titre alcoolique n'a pas changé.

L'acidité totale a par contre légèrement augmenté.

Acidité initiale : - 3 gr. 60 par litre

Acidité après un mois : 3 gr. 70 par litre

b) *Vin blanc* 13°. — Malgré plusieurs ensemencements nous n'avons pas observé de culture.

c) *Vin rouge* 10°. — La culture est encore moins accentuée que sur le vin blanc de même titre. La viscosité ne dépasse pas 21°. Le dépôt filant est par contre un peu plus abondant.

d) *Vin de muscat*. — Nous n'avons pu obtenir aucune culture sur ce milieu.

Résumé

L'acidité et le titre alcoolique des vins gênent le bacille et l'empêchent de produire une grande viscosité.

C) Etude du cidre

Ce bacille donne une viscosité moindre que la Torule. Le dépôt visqueux ne se forme qu'après plusieurs semaines de culture, il est coloré en beau jaune d'or.

Le titre alcoolique du liquide n'est pas modifié, par contre, l'acidité a augmenté.

D) Etude de la bière

Van Laër (*loc. cit*) affirme que ses bacilles visqueux ajoutés à la bière, après fermentation ne la font plus

filer, mais, qu'après addition de carbonate d'ammoniaque, le filage se produit plus rapidement que dans le moût stérilisé.

Il y a analogie sur ce point entre notre Bacille n° 1 et ceux de Van Laër. En culture sur bière du commerce, non stérile, possédant la totalité de son gaz carbonique, le Bacille n° 1 ne produit pas de viscosité, mais en ajoutant 0,5 % de carbonate d'ammoniaque, le milieu devient très visqueux.

Sur bière stérile, privée de son acidité volatile, on obtient cependant une culture visqueuse.

L'acidité initiale de la bière débarrassée de son gaz carbonique était, en acide sulfurique de 1 gr. 60 par litre.

Après un mois de culture elle était devenue 1 gr. 82.

E) *Etude du pain*

Le Bacille n° 1 donne au pain une coloration jaune mais le milieu n'apparaît pas mou et gonflé comme dans le cas de la Torule. Cependant le liquide inférieur est jaune visqueux de réaction acide, il réduit la liqueur de Fehling.

CHAPITRE III

Influence des agents extérieurs

1) ACTION DE L'OXYGÈNE

Aérobie facultatif. Le bacille cultive aussi en anaérobiose et donne alors un dépôt visqueux jaune. La viscosité est bien moindre qu'au contact de l'air.

Dans les deux cas, l'acidité du milieu croît avec l'âge de la culture, le sucre est peu à peu consommé.

Il ne se forme pas d'alcool. Le dégagement de gaz carbonique est plus appréciable que pour la *Torule*.

2) ACTION DE LA TEMPÉRATURE

A) *Le froid*

Il ne se produit pas de culture visqueuse au dessous de $+ 10^{\circ}$.

Toutefois les bacilles ne sont pas tués ; replacés dans des conditions favorables, ils donnent à nouveau des cultures visqueuses.

B) *La chaleur*

La température mortelle est $+ 54, + 55^{\circ}$. Mais la viscosité cesse de se produire vers $+ 45^{\circ}$.

La température optimum est $+ 35, + 36^{\circ}$.

3) ACTION DE LA LUMIÈRE

Cet agent paraît sans action sur le bacille.

4) ACTION DE LA DESSICCATION

Le bacille est plus sensible que la *Torule* à la dessiccation. La pellicule jaunâtre, obtenue par dessiccation de la glaire, perd la propriété de donner des cultures visqueuses, après trois ou quatre jours d'étuve à $+ 37^{\circ}$.

5) ACTION DU pH DU MILIEU A 25°

Le milieu d'étude employé est le liquide de Hansen n° 1.

Nous avons recherché : A) les pH limites et le pH optimum ; B) les modifications du pH causées par le bacille.

A) *pH limites et pH optimum.*

Nous avons essayé, comme pour la *Torule*, des milieux pH = 1,67, pH = 2,2, pH = 3,25, pH = 3,9, pH = 4,5, pH = 6,1, pH = 7,17, pH = 8,8, pH = 9,5.

Il ne se produit aucune culture pour pH = 1,67 et pour pH = 2,2.

Il est nécessaire de réensemencer pour pH = 3,25. Le Bacille n° 1 végète dans ce milieu, sans produire de fermentation visqueuse appréciable.

Nous avons obtenu des cultures visqueuses dans tous les autres milieux. Les résultats figurent dans le tableau ci-dessous :

TEMPS D'ÉCOULEMENT	avant ensemencement	après 7 jours	14 jours	21 jours	1 mois
pH des milieux :					
3,9	9'	13	15	14	12
4,5	9'	17	19	20	18
6,1	10'	23	28	30	27
7,17	10'	24	26	28	27
7,8	10'	20	24	26	25
8,8	10	18	20	23	24
9,5	10	16	19	21	22

En résumé, le Bacille n°1 ne cultive pas dans des milieux dont le pH est supérieur à 3,25.

Il a été impossible d'établir l'autre limite.

Enfin le pH initial optimum se trouve compris entre 6,1 et 8,17.

B) *Modifications du pH du milieu.*

Le bacille, placé dans les mêmes conditions que la Torule, produit une augmentation d'acidité : 10 cc. de bouillon préalablement neutralisés puis ensemencés, exigent 1 cc. 2 de solution de soude N/10 pour revenir à neutralité, après un mois de fermentation visqueuse à 25°.

Soit en acide lactique : 1 gr. 08 par litre.

L'acidité produite varie suivant la réaction initiale du milieu :

Liquide de Hansen :

pH = 3,25	acidité constante
pH = 4,5	acidité constante
pH = 3,9	acidité constante

pH initial = 6,1	pH après un mois de culture à 25° = 4,8
pH — = 7,17	pH — = 5,2
pH — = 7,8	pH — = 5,4
pH — = 8,8	pH — = 5,9
pH — = 9,5	pH — = 6,6

La réversibilité du phénomène visqueux commence en général dès que l'acidité cesse d'augmenter.

Ce phénomène se produit vers la troisième semaine pour les pH < 7,8. vers un mois pour pH < 8,8, vers mois pour les pH voisins de 9,5.

Ces limites sont d'ailleurs variables avec les conditions de l'expérience.

Si on remplace la peptone du liquide de Hansen par un autre corps azoté tel que, l'urée, le tartrate d'ammoniaque, l'asparagine et le succinate d'ammoniaque, on obtient les résultats suivants :

Urée.

pH initial = 7,8, après un mois de cult. :	pH = 5,2
Viscosité = 10	viscosité = 29

Tartrate d'ammonium.

pH initial = 5,6, après un mois de cult. :	pH = 4,6
Viscosité = 10	viscosité = 20

Asparagine.

pH initial = 7,2, après un mois de cult. :	pH = 5,6
Viscosité = 10	viscosité = 35

Succinate d'ammonium.

pH initial = 6,1, après un mois de cult. :	pH = 4,6
Viscosité = 10	viscosité = 24

La rapidité de l'interversion du saccharose est moindre que pour la Torule.

pH des milieux	Saccharose resté en solution après un mois de culture	
pH = 4,5	1/5	du sucre total
pH = 6,1	1/3	<i>Ib.</i>
pH = 8,8	3/4	<i>Ib.</i>
pH = 9,5	7/8	<i>Ib.</i>

La résistance de ce bacille à l'acidité est particulièrement remarquable et en opposition avec les propriétés habituelles des bactéries qui ne supportent en général qu'une acidité du milieu extrêmement faible.

Notre organisme constitue donc un exemple très rare d'acidophilie marquée.

6) ACTION DU CALCIUM

Les géloses oxalatées produisent une exaltation de la viscosité des cultures du Bacille n° 1.

On constate le phénomène contraire après plusieurs passages sur géloses calcifiées. Il est nécessaire de pratiquer quatre ou cinq repiquages pour que les différences soient accentuées.

7) ACTION DES ANTISEPTIQUES

a) *Le chlore*

Ce bacille, comme la Torule, supporte des doses élevées de chlore ; il faut environ 7 à 8 centigrammes de cet antiseptique en solution pour tuer le germe visqueux.

b) *L'acide sulfureux*

Cet organisme, moins résistant que la Torule, est tué par 400 milligrammes de gaz sulfureux par litre.

c) *L'acide salicylique*

Le Bacille n° 1 résiste à 1 % d'acide salicylique par litre, mais cette dose est une dose limite.

d) *Le fluorure de sodium*

Ce sel employé à dose de 1,5 % empêche la fermentation visqueuse de se produire.

e) *Le tanin*

Le bacille comme la Torule supporte 1 % de tanin. Il en faut 1,5 à 2 % pour empêcher la viscosité de se développer.

Ce corps agit par action mécanique déterminant la floculation de la glaire plutôt que par action antiseptique proprement dite.

CHAPITRE IV

Modifications que la fermentation visqueuse fait subir au milieu

1) MODIFICATIONS QUE LE FERMENT FAIT SUBIR A L'AZOTE DU MILIEU

Nous avons réalisé deux séries d'essais :

- a) avec du bouillon sucré stérile.
- b) avec du bouillon sucré visqueux

Les analyses, faites une semaine puis un mois après ensemencement, n'indiquent pas de perte sensible d'azote.

2) MODIFICATIONS PRODUITES PAR LE FERMENT SUR LE SUCRE EN SOLUTION

Nous avons employé pour ce bacille, un seul milieu, le bouillon saccharosé de composition identique à celui utilisé pour la *Torule*, contenant 7 gr. 30 de sucre pour 100 cc. de solution.

Après un mois de fermentation, la déviation A était de : $A = - 2^{\circ} 24$; le poids p de sucre réducteur était : $p = 2$ gr. 5 %.

Après interversion, la déviation est de : $- 8^{\circ} 44$.

Au moyen des formules indiquées précédemment, on obtient :

Sucre après fermentation :

Saccharose $z = 3$ gr. 50 % de solution.

Glucose $x = 0$ gr. 50 % de solution.

Lévulose $y = 2$ gr. % de solution.

Saccharose consommé 1 gr. 50, correspondant à la totalité du glucose disparu.

Le processus de l'attaque du saccharose peut être établi, pour ce bacille comme pour la Torule.

3) PRODUCTION D'ACIDES ORGANIQUES

Nous avons vu les modifications que le Bacille faisait subir au milieu. Nous avons caractérisé dans du bouillon visqueux, non seulement les trois acides formique, acétique et lactique, mais encore l'acide butyrique à l'état de traces à en juger par la teinte rose du réactif.

CHAPITRE V

La substance glaireuse

1) OBTENTION DE LA GLAIRE

Le bacille ne peut pas donner beaucoup de glaire sur carotte. Son milieu de choix est le bouillon glucosé à 20 ou 30 %. Ce milieu ensemencé donne en quelques jours, parfois à 35°, une prise en masse du liquide.

Cette gelée est lavée, centrifugée. Il est également prudent de lui faire subir un traitement rapide, sous peine de la voir disparaître progressivement.

La glaire ainsi obtenue est jaune d'or. Lors des phénomènes d'autodigestion de la glaire, on observe au fur et à mesure de la consommation, un changement de la teinte, qui devient jaune foncé. Le liquide résultant de la dissolution est brun.

La déviation de ce liquide, décoloré et examiné au polarimètre, est dextrogyre. Il réduit la liqueur de Fehling. L'osazone présente les caractères de la glucosazone, enfin la réaction de Berg est positive.

2) FLOCCULATION DE LA GLAIRE

Nous avons constaté des phénomènes de floculation analogues à ceux décrits pour la Torule.

La densité joue son rôle, nous n'avons pas observé de floculation dans des liquides de densité supérieure à 1,25.

3) ESSAIS DE COLORATION DE LA GLAIRE

La glaire retient mal les colorants. Nous avons essayé tous les procédés de coloration énumérés pour la Torule. Les bleus de méthylène et de toluidine colorent bien en bleu le bâtonnet lui-même, mais la substance constitutive de la gaine est restée incolore.

La méthode de Neisser ne nous a pas donné meilleur résultat.

Seule la méthode de Gins permet de constater la gaine glaireuse.

4) ETUDE CHIMIQUE DE LA GLAIRE

Sur la glaire obtenue on fait les recherches suivantes :

A) Azote total contenu dans la glaire

Le mucus provient du bouillon glucosé. Cinquante centigrammes de glaire ont dégagé 2 cc. 4 d'azote par la méthode de Kjeldahl, soit en poids : 2 milligr. 75.

B) Hydrolyse de la glaire. —

Recherche et identification du sucre formé

La solution sucrée provenant de l'hydrolyse de 5 gr. de glaire était dextrogyre. La déviation A était de $+ 2^{\circ} 30'$.

4 cc. de filtrat réduisaient 20 cc. de liqueur de Fehling, soit 2 gr. 50 % de sucre en glucose.

Nous avons pratiqué sur le produit d'hydrolyse les réactions indiquées par Perrot (*loc. cit.*) et nous avons conclu que ce produit est du glucose.

En résumé, le processus de la fermentation visqueuse produite par le Bacille n° 1 est bien analogue, si on en juge par les résultats obtenus, à la fermentation causée par la Torule.

TROISIÈME PARTIE

Etude du ferment de l'eau

CHAPITRE PREMIER

Étude morphologique

A) ORIGINE. — ISOLEMENT

Le troisième germe fut isolé d'une eau souillée prélevée dans un puits, rue Saint-Nicolas, à Angers.

Cette eau est portée sur tubes de gélatine peptonée, qu'on coule sur boîte de Pétri stérile avant solidification complète.

On porte à l'étuve à 25°, dès que la gélatine est solidifiée.

Parmi les colonies, les unes étaient légèrement ocre et visqueuses ; sur gélose inclinée elles ne redonnaient pas leur pigment ; mais sur bouillon peptoné, le dépôt était souvent gris-rose.

B) MORPHOLOGIE

L'organisme isolé est un bâtonnet moins grêle que le précédent, long de 1 μ à 2 μ , large de 0,7 à 0,8 μ .

Les éléments sont le plus souvent agglomérés en paquets. Les chaînettes sont rares et ne dépassent jamais trois à quatre unités.

Le bacille ne prend pas le Gram, n'est pas mobile. (L'immobilité paraît être de rigueur chez les germes

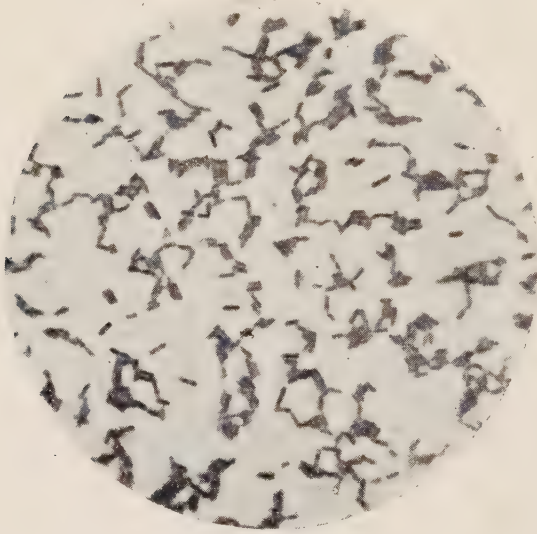


Fig. 7. — Bacille de l'eau visqueuse (grossissement : 1.300)
(Culture sur gelose glucosée)

visqueux, seuls le « *Bacillus gummosus* » de Happ et le Bacille courbe de Kayser et Delaval font exception à cette règle).

Enfin le bacille n'a pas de cils et la gaine visqueuse qui l'entoure n'est apparente que sur fond noir.

Nous n'avons pas observé de sporulation.

Nous avons désigné le germe sous la rubrique Bacille n° 2.

C) DÉVELOPPEMENT

Nous avons suivi le développement de cette bactérie de la même manière qu'il a été décrit pour le Bacille n° 1. Le mode de division est aussi le cloisonnement transversal.

CHAPITRE II

Milieux de culture

1) MILIEUX USUELS

A) *Bouillon peptoné*. — La viscosité est en général moins prononcée que pour les organismes précédents. Le dépôt est souvent de couleur rouille, mais ce résultat n'est pas constant, le pigment de ce bacille se manifeste de façon aussi capricieuse qu'indéterminée.

Comme pour les autres organismes, la culture ne dégage aucune odeur caractéristique.

B) *Gélose inclinée*. — Les colonies sont d'un gris sale, quelquefois rouille, à bords renflés, avec un godet au centre. Comme pour les autres germes visqueux, on obtient de bien plus belles colonies en ajoutant du sucre à la gélose.

C) *Gélose à la bière*. — On suit le mode indiqué pour la Torule. Les colonies géantes obtenues sont de couleur gris sale, très rarement rouille ; elles présentent un relief accentué. Au point central il se forme une sorte de cratère. Sur la gélose se détachent une série de vagues dont les crêtes sont colorées et visqueuses ; à la périphérie de la culture les bourrelets sont plus saillants. Ces colonies sont relevées sur les bords.

D) *Gélatine*. — Le Bacille n° 2 ne cultive pas en

profondeur quand on l'ensemence en piqure. A la surface, il se forme des colonies blanchâtres.

La gélatine n'est pas liquifiée.

E) *Carotte*. — On obtient sur ce milieu un voile sec en apparence, mais glaireux en réalité. Le liquide sous-jacent est à peine trouble et visqueux.

F) *Betterave*. — Les cultures sur ce milieu sont maigres, on les distingue à peine, mais le liquide sous-jacent est trouble et visqueux.

G) *Pomme de terre*. — Ce milieu convient médiocrement aux organismes bacillaires visqueux. Le Bacille n° 2 donne un voile à la base de la tranche. Le liquide sous-jacent est à peine visqueux.

2) ETUDE DES SUCRES, ALCOOLS POLYATOMIQUES, ET HYDRATES DE CARBONE

Ces substances sont étudiées :

- 1) Dans du bouillon peptoné.
- 2) Dans du liquide de Hansen n° 1.
- 3) En simple solution dans l'eau.

1) *Milieux au bouillon peptoné avec :*

A) *Saccharose*. — C'est un milieu suffisant, mais, en général, la viscosité est moins accentuée que pour les germes précédents.

B) *Glucose*. — La viscosité du bouillon glucosé varie plus que pour les autres germes avec la réaction du milieu. Nous avons obtenu dans certains cas la prise en masse du milieu. Le glucose est le sucre de choix pour le Bacille n° 2.

C) *Lévulose*. — Le Bacille cultive mal sur ce milieu.

Nous avons obtenu un voile muqueux à la surface du liquide, mais ce résultat n'est pas constant. Le milieu est peu visqueux.

D) *Mannose*. — La culture en présence de mannose ne diffère de la culture en présence de lévulose que par l'absence de voile.

E) *Maltose*. — La viscosité du milieu est encore plus faible que pour le milieu au lévulose.

F) *Lactose et galactose*. — La viscosité des bouillons lactosés et galactosés ne diffère pas sensiblement de la viscosité du bouillon non sucré.

G) *Glycérine et mannite*. — Ces alcools polyatomiques conviennent mal au Bacille n° 2. La viscosité du bouillon est peu marquée.

H) *Hydrates de carbone*. — Le Bacille n° 2 cultive aussi difficilement sur ces milieux. Le pigment rose se manifeste souvent en présence de dextrine, fait que nous n'avons jamais observé en présence d'inuline ou d'amidon.

2) *Milieux au liquide de Hansen n° 1*

Les cultures du Bacille n° 2 ont été soumises comme celles des organismes précédents, aux essais viscosimétriques.

Les résultats obtenus ont été condensés dans le tableau ci-dessous :

DEGRÉS VISCOMÉTRIQUES A 15°	Avant ensemencement	4 jours après	8 jours	15 jours	1 mois	2 mois
Liquide de Hansen sans sucre.....	17	21	23	25	26	23
Liq. de Hansen sans peptone + 10 0/0 glucose.	18	24	31	36	37	32
Liq. de Hansen + peptone + 2 0/0 glucose..	17	22	27	32	35	32
Ib. + 5 0/0 glucose....	18	24	32	39	42	37
Ib. + 10 0/0 glucose...	18	30	38	45	51	48
Ib. + 20 0/0 glucose...	19	33	49	58	67	66
Ib. + 10 0/0 saccharose	18	27	35	41	47	43
Ib. + 10 0/0 lévulose ..	18	24	28	31	33	28
Ib. + 10 0/0 mannose .	18	23	27	29	30	26
Ib. + 10 0/0 maltose...	18	22	23	27	28	24
Ib. + 10 0/0 lactose ...	18	21	24	26	25	24
Ib. + 10 0/0 galactose .	18	20	22	25	27	25
Ib. + 10 0/0 glycérine.	18	22	26	28	27	26
Ib. + 10 0/0 mannite ..	18	23	27	28	29	26
Ib. + 2 0/0 amidon....	19	23	25	26	24	23
Ib. + 10 0/0 dextrine..	21	25	28	28	27	24
Ib. + 10 0/0 inuline...	18	21	24	26	26	23

3) *Sucres, alcools polyatomiques, hydrates de carbone, en solution dans l'eau*

Les solutions de saccharose et de glucose deviennent seules très visqueuses. Les solutions de lévulose et de mannose sont à peine visqueuses.

La viscosité est proportionnelle à la quantité de sucre en solution.

Un sirop de saccharose de densité = 1,32 cesse de couler, comme le Bacille n° 1, deux mois environ après ensemencement. Le sirop reste incolore. Plusieurs mois après, le sirop a repris en partie sa fluidité.

Résumé

Le Bacille n° 2, comme les ferments précédents, produit sa viscosité au dépens du sucre en solution.

Le saccharose et le glucose conviennent seuls, les autres sucres, alcools polyatomiques, hydrates de carbone n'entretiennent pas la viscosité.

TABLEAU SCHEMATIQUE
de l'action des microorganismes étudiés, sur les sucres,
alcools polyatomiques et hydrates de carbone

	TORULE	BACILLE N° 1	BACILLE N° 2
Saccharose....	Milieu très favorable cultures très visqueuses	Milieu favorable	Légère viscosité, peu de différence entre ces deux sucres
Glucose.....	Milieu favorable	Milieu très favorable grande viscosité	
Lévuiose.....	Milieu donnant une viscosité moindre	Viscosité moindre	Viscosité très faible
Mannose	Grande analogie avec le lévulose	Viscosité un peu moins accentuée que pour le lévulose	Viscosité très faible
Maltose.....	Nécessité de plusieurs ensemencements	Milieu favorable	Nécessité d'ajouter du bouillon
Lactose.....	Ces sucres entretiennent mal la viscosité		
Galactose			
Glycérine.....	Légère viscosité	Nécessité de réensemencer copieusement pour obtenir une légère viscosité	<i>Ib.</i>
Mannite.....	Légère viscosité		Les alcools poly- atomiques et les hydrates de carbones n'entretiennent pas la viscosité pour ce bacille
Dextrine.....	Viscosité analogue au lévulose	Viscosité analogue au lévulose	
Inuline	Viscosité analogue au lévulose	Milieu moins favorable	
Amidon.....	Viscosité très légère nécessité de réensemencer	Nécessité d'ajouter du bouillon	

3) ETUDE DES MILIEUX AZOTÉS

A) Etude de la peptone

On obtient, en ensemençant l'eau peptonée, un liquide peu filant, que ce soit à 1, 2, 5 ou 10 %. La dose optima est 10 %. La culture est inodore. Il ne se produit pas d'indol.

Nous avons résumé les résultats obtenus en fonction des degrés viscosimétriques, dans le tableau ci-dessous.

DEGRÉS VISCOSIMÉTRIQUES	avant ensem- cement	4 jours après	8 jours	15 jours	1 mois	2 mois
Sol. de peptone :						
à 1 0/0	16 1/2	21	22	23	22	21
à 2 0/0	17	22	24	24	22	21
à 5 0/0	17	22	25	25	24	22
à 10 0/0	17 1/2	23	25	26	26	23
à 20 0/0	18	23	24	25	25	22

B) Etude de l'albumine cuite

Il se forme sur l'albumine cuite un enduit couleur rouille, le liquide sous-jacent devient légèrement rose et visqueux ; l'albumine est digérée peu à peu quoique moins rapidement que par les deux germes précédents.

Le liquide rose donne la réaction de l'ammoniaque (Réactif de Nessler), réduit la liqueur de Fehling.

La réaction du biuret positive indique la présence de peptones.

C) *Etude des sels ammoniacaux*

a) *Le chlorhydrate d'ammoniaque.* — On n'obtient pas de viscosité avec ce sel en solution à 0,5 et à 1 %.

b) *Le carbonate d'ammoniaque.* — Ce sel, au contraire, en solution à 1 % favorise la viscosité.

c) *Le succinate et le tartrate* ont une action moins favorable.

D) *Etude des nitrates*

Le nitrate de potasse, en solution à 1 %, dans du bouillon, n'affecte pas le ferment. La viscosité comparée avec celle d'un témoin sans nitrates lui est identique.

E) *Etude des nitrites*

Le nitrite de potasse, en solution à 1 %, paraît également sans action sur les cultures de Bacille n° 2.

F) *Etude des amides*

L'urée, en solution à 1 %, favorise le développement du bacille.

G) *Etude des nitriles*

Le Bacille n° 2 résiste mieux, que les germes précédemment étudiés, à l'action de l'acide cyanhydrique, la viscosité subsiste à la dose de 5 0/00. Il faut 1 % pour tuer le bacille.

H) *Etude de l'ammoniaque et des amines*

Comme pour le Bacille n° 1, ces corps conviennent à faible dose, mais au-delà de 0,5 %, le contraire se produit.

I) *Etude des acides aminés*

Le Bacille n° 2 a donné sur les milieux à l'asparagine, des résultats analogues aux deux autres germes.

K) *Etude des amino-alcools*

Le chlorhydrate de choline, en solution à 1 %, semble laisser indifférent le Bacille n° 2.

Résumé

Le Bacille n° 2 peut cultiver non seulement en eau peptonée ou sur albumine cuite comme les organismes précédents, mais encore en solutions très diluées d'ammoniaque, d'urée et de sels ammoniacaux à acides faibles. Ces corps suffisent à entretenir la vie du bacille, mais il ne résulte pas de la culture une viscosité appréciable.

Pour obtenir une culture visqueuse, il est nécessaire d'ajouter du sucre. Néanmoins, les corps précités exercent une action adjuvante beaucoup plus nette que sur le Bacille n° 1 et la Torule.

4) ETUDE DES MILIEUX NATURELS

A) *Etude du lait*

Quinze jours après ensemencement, il faut 24 secondes à 1 cc. de lait pour s'écouler.

Il faut environ un mois pour que le liquide se prenne en masse visqueuse quelquefois colorée en rose.

Cette masse visqueuse reste homogène, il n'y a pas séparation.

Le Bacille n° 2 ne secrète ni présure, ni caséase.

Le lait visqueux est devenu acide : après un mois de culture, 10 cc. de glaire délayés dans un peu d'eau, sont neutralisés par 1 cc. de soude N/10 ce qui correspond à 0 gr. 90 d'acide lactique par litre.

B) *Etude du vin*

Le Bacille n°2 ne communique aucune viscosité aux quatre types de vins essayés.

Seul, le vin rouge laisse, après un mois de culture, un dépôt rougeâtre légèrement visqueux.

C) *Etude du cidre*

Nous n'avons pas obtenu de cultures visqueuses sur ce milieu.

D) *Etude de la bière*

Ce bacille donne une viscosité peu accentuée sur ce milieu.

La présence de gaz carbonique ne paraît pas avoir une grande influence sur les cultures.

Il se forme, une quinzaine de jours après ensemencement, un dépôt glaireux de couleur rouille.

E) *Etude du pain*

Ce bacille n'a modifié le milieu en aucune façon. Le liquide inférieur est à peine visqueux, ne réduit pas la liqueur de Fehling, sa réaction est légèrement acide. Cette acidité n'a pas augmenté.

CHAPITRE III

Influence des agents extérieurs

1) ACTION DE L'OXYGÈNE

Le Bacille n° 2 est encore un aérobie facultatif, bien qu'il préfère le contact de l'air.

Sa culture en anaérobiose est légèrement visqueuse. Le dépôt est blanchâtre.

Ce bacille augmente l'acidité du milieu, consomme le sucre, ne produit pas d'alcool et dégage peu de gaz carbonique.

2) ACTION DE LA TEMPÉRATURE

A) *Le froid*

Nous n'avons pas observé de fermentation visqueuse au-dessous de $+ 10^{\circ}$. Néanmoins le Bacille n° 2, comme les autres organismes visqueux, n'est pas tué par le froid. Ses cultures replacées dans des conditions favorables deviennent filantes.

B) *La chaleur*

La fermentation visqueuse cesse de se produire vers 4° . La température mortelle pour le Bacille est 45° - 46° . La température optimum est 25° - 28° .

Nous avons résumé les résultats obtenus dans le tableau ci-dessous :

	TORULE	BACILLE N° 1	BACILLE N° 2
moins de + 10°	La viscosité ne se produit pas		
de + 10 à + 25°	La viscosité croit en fonction de la température		
de 25 à 30°.....			Optimum
de 30 à 35°.....	Optimum		La viscosité décroît
de 35° à 38°.....	La viscosité décroît	Optimum	
au-dessus de 40°	Plus de viscosité		
de 40 à 45°....			Températ ^{re} mortelle
de 45 à 50°	Températ ^{re} mortelle		
de 50 à 55°.....		Températ ^{re} mortelle	

3) ACTION DE LA LUMIÈRE

La lumière ne paraît pas exercer d'action sur les cultures de Bacille n° 2.

4) ACTION DE LA DESSICCATION

Le Bacille n° 2 résiste mal à la dessiccation. Le pellicule grise obtenue par dessiccation de la glaire à 37° a perdu la propriété de donner des cultures visqueuses.

5) ACTION DU pH DU MILIEU A 25°

A) *pH limites et pH optimum.* — Nous avons essayé comme pour les germes précédents des milieux de réactions suivantes :

pH = 1,67, pH = 2,2, pH = 3,25, pH = 3,9, pH = 4,5, pH = 6,1, pH = 7,17, pH = 8,8, pH = 9,5.

Le Bacille n° 2 ne cultive pas dans les milieux dont le pH est inférieur à 4,5.

Nous obtenons une culture à peine visqueuse pour pH = 4,5. La fermentation visqueuse s'est produite dans tous les autres milieux. Nous avons condensé les résultats dans le tableau ci-dessous :

TEMPS D'ÉCOULEMENT à 25°	avant ensemencement	après 7 jours	14 jours	21 jours	1 mois
pH des milieux :					
4,5	9'	11'	13'	12'	10'
6,1	10'	17'	20'	22'	21'
7,17	10'	19	27	30	30
7,8	10'	23	32	36	38
8,8	10'	38	54	prise en masse du liquide (1)	
9,5	10'	20	26	30	31

En résumé on peut admettre que le pH limite côté acide de l'échelle se trouve situé vers pH=4,5. Il a été

(1) Le liquide recommence à couler deux mois environ après ensemencement, la viscosité décroît ensuite très lentement.

par contre impossible de déterminer la limite côté alcalin.

La pH optimum se trouve situé vers 8,8.

B) *Modification du pH du milieu.* — Le Bacille n° 2 est aussi producteur d'acidité. Il faut 0 cc. 4 de solution de soude N/10, pour saturer l'acidité contenue dans 10 cc. de bouillon, après un mois de fermentation visqueuse. Ce qui correspond à une production de 0 gr. 36 d'acide lactique par litre.

L'acidité produite varie d'ailleurs avec la réaction initiale du milieu.

Liquide de Hansen :

pH initial=4,5 (maigre culture, viscosité très faible). Acidité constante.

pH initial = 6,1	pH final après un mois de culture à 25° = 5,8
— = 7,17	— = 6,3
— = 7,8	— = 6,6
— = 8,8	— deux mois (1) = 6,8
— = 9,5	— un mois = 7,3

Le pH du milieu décroît sous l'influence de la culture du Bacille n° 2, jusqu'à une zone limite qui varie avec les conditions de l'expérience.

Si on remplace la peptone du liquide Hansen par d'autres corps azotés, on obtient des résultats différents.

Urée :

pH initial = 7,8	après un mois de culture : pH = 5,6
viscosité : 86	— viscosité : 36

(1) Nous avons dû attendre que le liquide pris en masse recommence à couler.

Tartrate d'ammonium :

pH initial = 5,6	après un mois de culture : pH = 5,2
viscosité : 10	— viscosité : 32

Asparagine :

pH initial = 7,2	après un mois de culture : pH = 5,2
viscosité : 10	— viscosité : 32

Succinate d'ammonium :

pH initial = 6,1	après un mois de culture : pH = 5,9
viscosité : 10	— viscosité : 18

Enfin le saccharose est lentement interverti. La rapidité de l'intervention varie avec le pH du milieu.

pH des milieux	Saccharose resté en solution après un mois de culture
—	—
pH = 4,5	1/3 du sucre total
pH = 6,1	1/2 <i>Ib.</i>
pH = 8,8	5/6 <i>Ib.</i>
pH = 9,5	9/10 <i>Ib.</i>

6) ACTION DU CALCIUM

Il y a exaltation de la viscosité après plusieurs passages sur gélose oxalatée. Par contre les repiquages successifs de Bacille n° 2, sur gélose calcifiée, donnent des cultures de viscosités décroissantes.

7) ACTION DES ANTISEPTIQUES

a) *Le chlore*

Le Bacille n°2 est tué par 5 centigr. de chlore par litre.

b) *L'acide sulfureux*

Le Bacille n° 2 ne supporte pas plus de trois cents milligrammes d'acide sulfureux par litre.

L'acide salicylique, le fluorure de sodium et le tanin n'affectent pas plus le Bacille n° 2, que les autres ferments précédemment étudiés.

CHAPITRE IV

Modifications que la fermentation visqueuse fait subir au milieu

1) MODIFICATIONS QUE LE FERMENT FAIT SUBIR A L'AZOTE DU MILIEU

Nous avons opéré pour le Bacille n° 2 de la même manière que pour les deux autres germes. Les analyses, faites une semaine et un mois après ensemencement, n'indiquent pas le départ sensible d'azote.

2) MODIFICATIONS PRODUITES PAR LE FERMENT SUR LE SUCRE EN SOLUTION

Nous avons employé pour le Bacille n° 2, le bouillon saccharosé déjà indiqué, contenant 7 gr. de sucre pour 100 cc. de solution.

Après un mois de fermentation, la déviation A était de $A=+2^{\circ}20$, le poids de sucre réducteur était de $p=2$ gr. %, soit 1 gr. 90 en saccharose.

Après interversion la déviation était de $-4^{\circ}10$. Au moyen des formules précédemment indiquées on obtient :

Saccharose : $z = 3$ gr. 82 % après un mois de fermentation.

Glucose : $x = 0$ gr. 40 % après un mois de fermentation.

Lévulose : $y = 1$ gr. 50 % après un mois de fermentation.

Sucre consommé: 1 gr. 28 en saccharose. Cette quantité correspond à la totalité du glucose disparu.

3) PRODUCTION D'ACIDES ORGANIQUES

La production d'acidité étudiée précédemment est due à la présence d'acides acétique et lactique caractérisés dans le bouillon visqueux. Nous n'avons pu caractériser les acides formique et butyrique.

CHAPITRE V

La substance glaireuse

1) OBTENTION DE LA GLAIRE

La glaire est isolée par centrifugation de la masse visqueuse, obtenue dans un bouillon glucosé à 20 %.

Le mucus isolé est de couleur grise; il s'autolyse moins rapidement que celui des deux autres germes. Le liquide qui en résulte est jaunâtre, dévie à droite la lumière polarisée, réduit la liqueur de Fehling. Son ozasone présente les caractères de la glucosazone et la réaction de Berg est positive.

2) FLOCCULATION DE LA GLAIRE

Les phénomènes de floculation observés pour les organismes précédents ont été également constatés pour le Bacille n° 2.

La floculation ne se produit pas dans les liquides de densité supérieure à 1,25.

3) ESSAIS DE COLORATION DE LA GLAIRE

Nous avons essayé les colorations indiquées pour la Torule.

Les bleus de méthylène et de toluidine donnent les meilleurs résultats pour teindre le bâtonnet mais la gaine est restée incolore.

La méthode de Gins nous a permis de mettre la membrane hypertrophiée en évidence.

4) ETUDE CHIMIQUE DE LA GLAIRE

A) *Azote total contenu dans la glaire*

Cinquante centigrammes de glaire essorée produisent 1 cc. 9 d'azote ce qui donne en poids : 2 millgr. 22. Les quantités d'azote dégagées par la glaire des deux bacilles sont assez voisines. Pour la Torule, au contraire, la différence est notable.

B) *Hydrolyse de la glaire*

Identification du sucre formé

Le liquide d'hydrolyse de la glaire dévie à droite la lumière polarisée, réduit la liqueur de Fehling.

L'osazone obtenue avec ce liquide présente les caractères de la glucosazone.

La glaire, formée par le Bacille n° 2, produit donc du glucose comme l'hydrolyse de la glaire des deux organismes précédents.

CONCLUSIONS

La viscosité de la limonade étudiée est due à une Torule qui produit une glaire abondante, comme beaucoup d'autre microorganismes.

Deux autres bacilles visqueux ont été aussi étudiés, nous n'avons pas cru devoir les nommer en raison des incertitudes qu'ils présentent encore.

Ces trois ferments ne peuvent produire de glaire sans glucose ou saccharose. Certains sucres, alcools polyatomiques, hydrates de carbone entretiennent bien la vie des germes mais la viscosité qui se développe est toujours faible.

Les besoins en azote sont minimes. Les composés azotés agissent sur la fermentation dans la mesure où ils peuvent influencer sur la réaction du milieu.

Les milieux naturels sont inégalement favorables, l'alcool limite ou empêche le développement des germes visqueux.

De même que Meissner, Kayser et Manceau nous n'avons pas observé de « graisse du vin » au-dessus de 10°-12° alcooliques.

Nos microorganismes sont des aérobies facultatifs mais c'est en culture aérobie qu'on observe les degrés viscosimétriques les plus élevés.

La température exerce une action importante :

Au-dessous de $+10^{\circ}$, il ne se produit pas de filant.

Au-dessus de 45° les ferments sont tués rapidement.

La température optimum varie avec chacun d'eux.

La viscosité croît avec l'acidité du milieu, mais cette croissance n'est pas indéfinie, elle atteint une limite variant avec le milieu et avec sa réaction initiale. Cette limite marque le début de la reversibilité du phénomène; la décroissance se produit alors fort lentement, elle est à peine sensible dans certains cas.

Les antiseptiques sont pratiquement inopérants : il faut les employer à doses trop fortes pour songer à les utiliser dans la pratique des fabrications industrielles. Le tanin qu'on a préconisé autrefois, ne donne pas de résultats satisfaisants.

C'est que les germes visqueux sont bien abrités dans leur gangue glaireuse difficilement perméable. Cette gangue est formée aux dépens du glucose du milieu, ce sucre peut d'ailleurs être régénéré par hydrolyse.

En résumé, les fermentations visqueuses que nous avons étudiées sont dues à l'hypertrophie accompagnée d'un changement d'état de la membrane; cette hypertrophie est produite par condensation de plusieurs molécules de glucose empruntées au milieu.

Ce phénomène est d'ailleurs réversible, la membrane sous l'influence d'un excès d'acidité peut restituer partiellement le glucose qu'elle a pris.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Chaptal. — 1801 : Art de faire le vin, *Manuel*, 1913.
(*C. R. Ann. trav. Soc. Agric. départ. Marne.*)

Herpin. — 1919 : *De la graisse des vins.* (1 br., Châlons.)

François. — *Mémoire sur la cause de la graisse des vins* (1 br., Châlons-sur-Marne, 1929); *id.*, *Ann. Chimie*, 2^e série, XLIV (p. 212, 1929); *id.*, *Traité d'application du tanin pour prévenir la graisse des vins* (1 br., Châlons-sur-Marne, 1835).

Pasteur. — *Etudes sur le vin* (p. 60, 1 vol., Masson, édit., Paris, 1866).

Börsch. — *Beitrag zur Kenntniss der Bact. des Weines.* (Diss., Erlanger, 1883.)

Nessler. — *Die Bereitung und Behandlung des Weines.* (1884, p. 228, Stuttgart.)

Kramer. — Studien über die schleimige Gährung. (*Sitzungsber. der K. Acad. Wissensch. in Wien*, X, 1889, p. 467.)

Læffler. — Ueber Bakterien in der Milch. (*Berl. Klin. wochenschrift*, 1887.)

Adametz. — Ueber einen Erreger der schleimigen Milch. (*Milch Zeitung*, 1889, p. 941.)

Béchamp. — Sur la viscosité. (*C. R. Acad. des Sc.*, t. 78, 1882.)

Bräutigam. — Bildung des Dextrans (*Ph. Cent. Halle*, 1892, 33, 534.)

Hauer. — (*Süddeutsche Apoth. Zeit.*, 1892, 24.)

Nägeli. — (*J. prakt. Chem.*, (2), 17, 409.)

Ward. — Ropiness in the milk and cream. — (*Bull. of the cornel University agrict. experiment, station.*) Ithaca N. Y., 1889.)

Grâce et Percy Frankland. — Ueber einige typische Microorganismen im Wasser und Boden. (*Zeitchr. für Hyg.*, VI, 1889, p. 373).

Van Laër. — Note sur les fermentations visqueuses. (*Mémoires couronnés de l'Acad. royale de Belgique*, t. 53, 1889.)

Duclaux. — *Traité de chimie biologique*, p. 562 du t. IX, 1^{re} sec. de l'Encyclopédie chimique de Frémy.

Laurent. — La bactérie de la fermentation panaire. (*Bull. de l'Acad. royale de Belgique*, 3^e sér., t. X, n° 12, 1885.)

Lindner. — *Wochenschrift für Brauerei*, 1888, v. 290.

Hansen. — *Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie.* (München et Leipzig, Oldenbourg, 1890-1892, Heft 2, p. 43.)

Happ. — Bacteriologische und chemische Untersuchungen über die schleimige Gährung. (*Centralblatt. für Bakt.*, XIV. 1893, p. 175.)

Meissner. — Studien über das Zähewerden von Most und Wein. (*Landwirtschaftliche Jahrbücher*, XXVII Band, 1898, Heft 5.)

Van Tieghem. — Sur la gomme des sucreries. (*Ann. des sc. nat., Bot*, 6^e série, VII.)

Uffelmann. — Verbodenenes Brot. (*Centralblatt. für Bakt.* VIII, 1890, p. 481.)

Führmann. — Über die Erreger des Fadenziehens beim Brot, 1905. (*Centralblatt für Bakt.*, 2^e Abth., XIV, 1905, p. 385.)

Kaiser et Delaval. — Etude du pain visqueux. (*C. R. Acad. Sc.*, CLIII, 1911, p. 576.)

Nicolas. — Sur la consistance d'une angine pseudo-membraneuse atypique et d'un microbe nouveau. (*Archives de méd. expérimentale*, X, 1898, p. 573.)

Pane. — Zur Biologie eines pathogenen *Bacterium viscosum*. (*Centralblatt für Bakt.*, 1te Abth., Orig., XL, 1906, p. 279.)

Mazé et Pacottet. — Recherches sur la maladie des vins. (*Ann. de l'I. P.*, t. XVIII, 194, p. 245.)

Laborde. — Sur les ferments des vins gras ou filants. (*Procès-verbaux des séances de la Soc. Sc. phys. et nat.*, Bordeaux, 1904.)

Kayser et Manceau. — *Ferments de la graisse des vins*. (1 vol., Epernay, H. Villiers, 1909.)

Thöni et Thayssen. — Mitleig. a. d. geb. d. Lebensmittelsuntersuchung. (*Hyg. Berne*, Bd 3, 1912, H. 335, et *Centrablat. für Bakt.*, 1, 56, page 592, Referata.)

Fernbach et Schæn. — (*C. R. de l'Acad. des Sc.*, t. CLV, p. 84, 1912.) *Id.* (*C. R. Soc. Biologique*, t. XCII, p. 141, 1925.)

Guyot. — Fermentations visqueuses des limonades commerciales. (*Bull. Soc. de Pharmacie de Bordeaux*, 1927, page 138.)

Bordet et Renaux. — L'influence du calcium sur les cultures de charbon. (*Ann. I. P.* t. XLV, 1930, p. 23.)

VU: Bon à imprimer,

Le Président de thèse:

L. LUTZ.

VU: Le Doyen de la Faculté,

Paul GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer,

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Pour le Recteur :

L'Inspecteur d'Académie,

J. PERRON.

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
INTRODUCTION	9
HISTORIQUE ET BIBLIOGRAPHIE.....	11

PREMIÈRE PARTIE

Étude du ferment de la limonade

CHAPITRE PREMIER. — <i>Etude morphologique</i>	25
CHAPITRE II. — <i>Milieux de culture</i>	33
CHAPITRE III. — <i>Influence des agents extérieurs</i>	55
CHAPITRE IV. — <i>Modifications que la fermentation fait subir au milieu</i>	70
CHAPITRE V. — <i>La substance glaireuse</i>	80

DEUXIÈME PARTIE

Étude du ferment de la bière

CHAPITRE PREMIER. — <i>Etude morphologique</i>	93
CHAPITRE II. — <i>Milieux de culture</i>	95
CHAPITRE III. — <i>Influence des agents extérieurs</i>	105
CHAPITRE IV. — <i>Modifications que la fermentation fait subir au milieu</i>	111
CHAPITRE V. — <i>La substance glaireuse</i>	113

TROISIÈME PARTIE

Étude du ferment de l'eau

CHAPITRE PREMIER. — <i>Etude morphologique</i>	115
CHAPITRE II. — <i>Milieux de culture</i>	117
CHAPITRE III. — <i>Influence des agents extérieurs</i>	127
CHAPITRE IV. — <i>Modifications que la fermentation fait subir au milieu</i>	133
CHAPITRE V. — <i>La substance glaireuse</i>	135
CONCLUSIONS.....	137
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	139

